INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

UNIDAD OAXACA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

(INGENIERIA)

EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE COMPUESTOS FENOLICOS DE *Laelia furfuracea* (Orchidacea)

T e s i s

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

LOPEZ PEREZ ABIMAEL

Director de tesis:

DRA. LUICITA LAGUNEZ RIVERA

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Junio de 2016

SIP-14

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 13 del mes de mayo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca** (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: : "Extracción, cuantificación y actividad antiinflamatoria de compuestos fenólicos de *Laelia furfuracea* (Orchidacea)"

Presentado por el alumno:

López	Pérez	Abimael
Apellido paterno	materno	nombre(s)

Con registro: A 1 4 0 3 5 1

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

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dra. Lucila Lagunez Rivera

Dr. Celerino Robles Pérez

Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña

Dr. Manuel Jiménez Estrada

El PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

Director

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

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 13 del mes de mayo del año 2016, el (la) que suscribe **López Pérez Abimael**, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A140351, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dra. Luicita Lagunez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado: "Extracción, cuantificación y actividad antiinflamatoria de compuestos fenólicos de *Laelia furfuracea* (Orchidacea)", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó abima1008@gmail.com, Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

López Pérez Abimael

RESUMEN

Laelia furfuracea es una orquídea endémica del estado de Oaxaca, que se distribuye en la Mixteca y zonas montañosas que rodean los Valles Centrales. Utilizada como ornato para diversas celebraciones religiosas. Conocida localmente como “Ita ndeca” (morada) en la región de la Mixteca, las flores son utilizadas para la cura de la tos, no existe documentación escrita que valide científicamente el uso en la medicina tradicional de esta orquídea. Los objetivos de estudio fueron a) realizar un perfil fitoquímico; b) determinar la actividad antioxidante, concentración de flavonoides y fenoles totales del extracto hidroetanolico de flores, pseudobulbos y hojas; c) evaluar actividad antiinflamatoria del extracto hidroetanolico y fracciones orgánicas de diferentes polaridades de hojas. Para lo cual se utilizó el método de Harborne y Kokate para el perfil fitoquímico; 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) para actividad antioxidante, reactivo de Folin-Cicalteu para fenoles y tricloruro de aluminio para flavonoides. La evaluación de actividad antiinflamatoria se realizó con el modelo de edema subplantar con carragenina en ratas Wistar en diferentes dosis del extracto de hojas y fracciones. Se demostró la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, glicosidos cardiotónicos y quinonas en los extractos y fracciones; fuerte actividad antioxidante y altas concentraciones de polifenoles en los extractos de hojas y pseudobulbos. Una inhibición de 43.36% de la inflamación con la dosis de 1000 µg/pata del extracto de hojas contra un 45.71% de efecto que produjo el naproxeno. Los compuestos fenólicos identificados fueron 4-hydroxybenzyl alcohol (BHA), ácido málico, ácido cafeico y ácido siringico acetato por el método HPLC-MS. Se concluye que *L. furfuracea* podría ser utilizada como un potente antiinflamatorio en la medicina tradicional, posiblemente la actividad se deba a la presencia de polifenoles, y puede ser usado en investigaciones en el área cosmética y alimentaria

Palabras clave: *orquídea, uso medicinal, polifenoles, antiinflamación*

ABSTRACT

Laelia furfuracea is a endemic orchid is an endemic from state of Oaxaca, which is distributed in the Mixteca and mountainous areas surrounding the Valles Centrales. Used as decoration for various religious celebrations. Known locally as " Ita ndeca " (purple) in the region of the Mixteca , the flowers are used for the cure of cough , there is no written documentation that scientifically validate the use in traditional medicine of this orchid .The objectives of this study were a) make a screening phytochemical; b) determine the antioxidant activity, concentration of flavonoids and total phenolics of ethanol-water extract of flowers, pseudobulbs and leaves; c) evaluation of anti-inflammatory activity of ethanol-water extract and organic fractions of different polarities of leaves. For which the method of Harborne and Kokate for the screening phytochemical was used; 1,1-diphenyl -2 - picryl - hidrazilo (DPPH) for antioxidant activity , Folin- Cicalteu for phenols and aluminum trichloride for flavonoids. The evaluation of anti-inflammatory activity it was performed with the model of subplantar carrageenin edema in Wistar rats at different doses extract of leaf and fractions. The presence of flavonoids, tannins, saponins , cardiotonic glycosides and quinones in extracts and fractions was demonstrated ; strong antioxidant activity and high concentrations of polyphenols in extracts of leaves and pseudobulbs . Inhibition of 43.36% inflammation at a dose of 1000 μg / paw leaf extract against a 45.71 % of effect produced naproxen. Phenolic compounds 4 - hydroxybenzyl alcohol (BHA) , malic acid , caffeic acid and syringic acid acetate were identified by HPLC-MS method. It is concluded that *L. furfuracea* could be used as a potent antiinflammatory in traditional medicine, possibly activity is due to the presence of polyphenols, and may be used in research in the cosmetic and food area.

Keywords*: orchid, medicinal use, polyphenols, anti-inflammation*

CONTENIDO **pág**

CAPITULO I
PRESENTACIÓN
1.1 Introducción 10
1.2 Planteamiento del problema 12
1.3 Justificación 12
1.4 Antecedentes 14
1.5 Literatura citada 18
1.6 Objetivos 23
1.6.1 Objetivo general 23
1.6.2 Objetivos específicos 23
1.7 Hipotesis 23

CAPITULO II
MARCO REFERENCIAL
2.1 Las plantas en la medicina 24
2.1.1 Los productos naturales en la farmacología 24
2.1.2 Metabolitos secundarios en las plantas 25
2.2 Extracción convencional sólido-líquido 26
2.3 Las orquídeas 28
2.3.1 El género Laelia 28
2.3.2 *Laelia furfuracea* 29
2.3.3 Fitoquímicos en las orquídeas 29
2.4 Estrés oxidativo 30
2.4.1 Radicales libres y especies reactivas 30
2.4.2 Antioxidantes como sistema de defensa 31
2.5 Inflamación 32
2.5.1 Células que participan en el proceso inflamatorio 34
2.5.2 Especies reactivas de nitrógeno (RNS) 36
2.5.3 Enfermedades inflamatorias 37
2.5.4 Terapia inflamatoria 37
2.6 Modelos de evaluación antiinflamatoria 39
2.6.1 Evaluación *in vivo* 39
2.6.2 Evaluación *in vitro* 41
2.7 Literatura citada 43

CAPITULO III
PERFIL FITOQUIMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES DE EXTRACTOS HIDROETANOLICOS DE *Laelia furfuracea* (ORCHIDACEA)
Resumen
3.1 Introducción 47
3.2 Materiales y métodos 48
3.2.1 Colecta de materia prima 48
3.2.2 Preparación de las muestras 48
3.2.3 Perfíl fitoquímico 49
3.2.4 Actividad antioxidante por DPPH 51
3.2.5 Determinación de fenoles totales 52
3.2.6 Determinación de flavonoides totales 52
3.2.7 Detección de polifenoles por cromatografía en capa fina 53

3.3 Resultados 53
3.3.1 Perfil fitoquímico 53
3.3.2 Determinación de actividad antioxidante 54
3.3.3 Determinación de fenoles totales 54
3.3.4 Determinación de flavonoides totales 54
3.3.5 Detección de polifenoles por cromatografía en capa fina 55
3.4 Discusión 56
3.5 Literatura citada 58

CAPITULO IV
EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO HIDROETANOLICO DE HOJAS DE *Laelia furfuracea* (ORCHIDACEA)
Resumen
4.1 Introducción 62
4.2 Materiales y metodos 63
4.2.1 Colecta del material 63
4.2.2 Proceso de extracción 63
4.2.3 Perfil fitoquímico 64
4.2.4 Determinación de compuestos fenólicos 64
4.2.5 Evaluación de actividad antiinflamatoria 66
4.2.6 Actividad antioxidante *in vivo* 68
4.2.7 Analisis estadístico 69
4.2.8 Analisis de compuestos en HPLC-MS 69
4.3 Resultados 70
4.3.1 Perfil fitoquímico 70
4.3.2 Actividad antioxidante, flavonoides y fenoles totales 70
4.3.3 Actividad antiinflamatoria 71
4.3.4 Actividad antioxidante *in vivo* 73
4.3.5 Compuestos fenólicos por HPLC-MS 73
4.4 Discusión 74
4.5 Literatura citada 78

CAPITULO V
CONCLUSIÓN 83

INDICE DE FIGURAS

1 TLC para Flavonoides glicosidos revelados con NP/PEG de extracto de hojas (EH), extracto de pseudobulbo (EP) y extracto de flores (EF) de *Laelia furfuracea.*

2 Efecto antiinflamatorio del extracto hidroetanolico de hojas de *Laelia furfuracea.* Administración vía oral, $p<0.05$ 72

3 Efecto antiinflamatorio del extracto hidroetanolico de hojas de *Laelia furfuracea.* Administración vía local, $p<0.05$ 72

4 Cromatogramas de HPLC-MS de fracción hexanica del extracto hidroetanolico de hojas de Laelia furfuracea. Compuestos detectables de acuerdo a masas a) 4-hydroxybenzyl alcohol (107.130), b) ácido málico 74

(134.0874), c) ácido cafeico (180.0423) y d) ácido siringico acetato (239.0571).

INDICE DE CUADROS

1 Perfil fitoquímico de extractos de flores, hojas y pseudobulbos de Laelia furfuracea. Presente (+), ausente (-) 53

2 Determinación de actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales de extractos de *Laelia furfuracea*. 54

3 Perfil fitoquímico de EHHLF y fracciones de FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *L. furfuracea.* 70

4 Actividad antioxidante, flavonoides y fenoles totales contenidos en EHHLF y fracciones de FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *L. furfuracea* 71

5 Evaluación antiinflamatoria de fracciones de FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *L. furfuracea* 72

6 Efecto del EHHLF sobre los niveles de NO y GSH 73

ANEXOS

Fig. 5 *Laelia furfuracea* en su hábitat natural 84

Fig. 6 Extracción de materia prima de hojas de *Laelia furfuracea* con equipo Soxhlet a gran escala 85

Fig. 7 Perfil fitoquímico de extractos de flores, pseudobulbos y fracciones FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *Laelia furfuracea* 86

Fig. 8 Cromatografia en capa fina de extractos de flores, pseudobulbos y fracciones FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *Laelia furfuracea* 86

Fig. 9 Administracion del extracto y medición del edema en la pata de la rata 87

Fig. 10 Determinación de NO y GSH en tejidos de patas de ratas 88

Fig. 11 comparación de cromatogramas de fracciones FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *Laelia furfuracea* 89

Fig. 12 Masas de fracción FH de hojas de *Laelia furfuracea* 90

Abreviaturas

AINE´s Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos

BHA 4-hydroxybenzyl alcohol

DPPH 2,2´-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EHHLF Extracto hidroetanólico de hojas de *Laelia furfuracea*

FA Fracción acuosa

FB Fracción butanolica

FC Fracción clorofórmica

FEA Fracción acetato de etilo

FH Fracción hexanica

GSH Glutatión reducido

HPLC-MS Cromatografía líquida de alta resolución- espectrometría de masas

IAA Indice de actividad antioxidante

NO Oxido nitrico

OMS Organización Mundial de la Salud

RL Radicales libres

ROS Especies reactivas de oxigeno

RNS Especies reactivas de nitrógeno

TLC Cromatografia en capa fina

CAPITULO I

PRESENTACIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Los productos naturales ofrecen una gran diversidad química mayor sí se compara con la complejidad estructural y la potencia biológica. Además, que los productos naturales pueden ser utilizados como medicamentos, también tienen una gran utilidad en blancos moleculares y fisiopatologías de diferentes enfermedades, lo cual se ve reflejado en un mejor entendimiento de estos procesos (Bermúdez *et al*., 2005).

La incorporación y utilización de las plantas medicinales en el tratamiento de diversas reacciones inflamatorias son prácticas comunes en la medicina tradicional. Atribuido a los metabolitos secundarios que se definen como, sustancias químicas sintetizadas por los diferentes grupos de plantas, los cuales no participan directamente en actividades bioquímicas primarias o vitales para las plantas (Vanhaelen *et a*l., 1991).

Los metabolitos desempeñan roles importantes en la ecología vegetal, por ejemplo algunos compuestos fenólicos y terpenoides, funcionan como insecticidas o repelentes de organismos herbívoros, así como hormonas de insectos, fitoalexinas, agentes alelopáticos, reguladores del crecimiento vegetal, también poseen actividad fungicida o afectan en varios modos a organismos patógenos como los nematodos (Cy *et al*., 1985).

Las orquideas han sido usadas por milenios para la cura de diferentes tipos de enfermedades relacionadas con un efecto antiinflamatorio como dolor muscular, artritis reumatoide, asma, heridas, como broncodilatador y supresor de tumores (Musharof, 2011; Chinsamy *et al*. 2014). En México las orquideas se emplean principalmente como ornato en festividades religiosas (Cruz *et al*., 2015) y su uso en la medicina tradicional para la cura de ciertos padecimientos como la histeria, la fiebre, la impotencia, la disentería, el reumatismo

(Hernández, 1959), la diabetes (Neira, 2009), la tos (Cruz *et al*., 2014) cura de tumores (Cox, 2013), incremento de la energía del sistema muscular y como un afrodisiaco (Deanne, 2005). Los géneros *Prosthechea, Encyclia, Catasetum y Laelia* son empleadas para curar heridas, dolores de parto y como antiinflamatorios. Las flores de la especie *Laelia furfuracea* en la Mixteca de Oaxaca, México; se emplean para la cura de la tos en la medicina tradicional, pero no se ha validado científicamente este conocimiento, menos aún se conocen los compuestos bioquímicos en la orquídea.

Quizá el efecto biológico producido puede ser ocasionado por polifenoles. Los polifenoles son los responsables de la protección de la radicación UV y ataque de patógenos en las plantas. Ayudan a proteger a la celula del daño oxidativo y reduce el riesgo de desordenes degenerativos (Banafsheh *et al*., 2016). Se clasifican en diferentes categorías como acidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Wagner y Bladt, 2001). Los polifenoles más importantes son los flavonoides que son sintetizados por las plantas del aminoácido aromatico fenilalanina, tirosina y malonato. Los flavonoides se clasifican en seis subclases incluyendo flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianinas (Banafsheh *et al*., 2016).

El siguiente estudio surguió de la necesidad de conocer la actividad biológica que se le puede atribuir a *Laelia furfuracea* y conocer la composición fitoquímica que puede dar origen a tal efecto. Para validar el uso medicinal tradicional y dar la pauta a nuevas investigaciones en diversos campos. Por lo que, está investigación se dividio en dos partes. La primera consistió en hacer un análisis preliminar de los metabolitos secundarios que se encuentran en flores, hojas y pseudobulbos; de igual manera determinar actividad antioxidante y las concentraciones de flavonoides y fenoles en las tres diferentes partes de la planta. Los resultados previos sirvieron para elegir las hojas como la parte de la planta

con la que se evaluaría el efecto antinflamatorio y determinar los posibles compuestos que dan dicha actividad biológica.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La herbolaria ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana desde épocas precolombinas. De las 30,000 a 40,000 especies de plantas medicinales presentes en México, actualmente se han identificado hasta 5,000 especies con aplicaciones curativas. Algunas de estas especies pertenecen a la familia Orchidacea, en donde se han reportado el uso de las orquideas en la medicina tradicional, pero no han sido suficientes las investigaciones realizadas en estas plantas para generar conocimiento y validar su uso de las diferentes especies utilizadas. Tampoco se han identificado los compuestos fitoquímicos que causan la actividad biológica que se les atribuye y que mejoran la salud humana.

La especie *Laelia furfuracea* es usada como ornato y para la cura de la tos en la medicina tradicional esto se sabe por narraciones de personas de la región donde se encuentra. Pero no existen evidencias escritas del origen del uso medicinal o más información al respecto. Por tanto, es un campo de oportunidad para validar su uso medicinal y no solo eso, sino también realizar un estudio etnobotánico, etnofarmacéutico y bioquímico de la especie.

1.3 JUSTIFICACIÓN

El uso de las plantas en la medicina tradicional, ha permitido descubrir en la investigación farmacológica moderna nuevas drogas mucho más efectivas que la medicina sintética contemporánea. Algunos de estos compuestos o metabolitos secundarios de origen natural como terpenos y flavonoides poseen una gran variedad de efectos biológicos entre los que sobresale la actividad antiinflamatoria (Gerritsen *et al.*, 1995). Estos compuestos de origen natural no causan daño en el humano, sino al contrario, ayudan a reducir los efectos

secundarios que causa el uso crónico de fármacos para el tratamiento del dolor y la inflamación. Lo que representa un gran potencial en investigaciones farmacológicas.

Algunas investigaciones han comprobado que los extractos de orquideas, presentan compuestos naturales (Musharof, 2011) que curan ciertos padecimientos. Uno de ellos, es la inflamación, que ha despertado en los últimos años un gran interés científico, principalmente por la capacidad potencial de inferir en la evolución de enfermedades que comienzan con un proceso inflamatorio.

En México alrededor de 1300 especies y 170 géneros de orquideas están presentes, siendo una de las familias más ricas en número de especies, que es superada solo por Asteraceae y Fabaceae (Hágsater *et al.*, 2005), y el 40% de estas, son endémicas (Soto *et al*., 2007).

El género *Laelia* tiene la mayor distribución en México, y unas pocas especies crecen en el norte de Centroamérica en países como Guatemala y Honduras. De las 11 especies del genero *Laelia* presentes en México, solo se han investigado dos *L. anceps* y *L. autumnalis* relacionados con alguna acción biológica. Particularmente *Laelia furfuracea* es endémica para Oaxaca y de esta especie no se ha investigado nada aún, por lo que es importante comenzar a generar conocimiento científico que permita potencializar su uso en la medicina tradicional y en campos como la farmacéutica, alimentaria y cosmética.

De igual manera es necesario crear conciencia en las personas que se dedican a la venta de *L. furfuracea* en la época de celebraciones de muertos, de la virgen de Guadalupe y navidad; y no solo de esta especie sino de todas las orquídeas de la gran necesidad de crear planes de manejo para seguir conservando estas plantas y asi evitar el gran saqueo ilegal e irracional que hay año con año, buscando alternativas económicas para las comunidades a partir del cuidado, producción y venta de orquideas.

1.4 ANTECEDENTES

Los diferentes métodos que se utilizan para la determinación de la actividad antioxidante basan su fundamento en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. los diferentes métodos se diferencian en la eficacia en cuanto en términos del agente oxidante, la simplicidad, el sustrato empleado, el tiempo de evaluación, la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y las interacciones de la muestra con el medio de reacción, mecanismos, método de cuantificación y la relevancia biológica (Quintanar and Calderón, 2009). Los métodos para la evaluación de actividad antioxidante *in vitro* según Md *et al*., (2012) son la actividad captadora de DPPH, ensayo barrido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), actividad captadora de óxido nítrico actividad captadora del radical peroxinitrito y capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC) /ensayo por decoloración del radical catión ABST. El 2,2´-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) es uno de los métodos comúnmente aplicado en los últimos 10 años (Andrzej *et al*., 2012) para la cuantificación de actividad antioxidante de los residuos de radicales libres en extractos a partir de material de plantas o en compuestos individuales de las mezclas (Ozcelik et al., 2003; Scherer & Godoy, 2009; Sharma & Bhat, 2009) en la cinética de fenoles que se comportan como la reacción ET que implica una reacción redox con el oxidante como un indicador en la reacción del punto final, con correlación del cambio del grado de color con la concentración de antioxidante Foti et al (2004). A partir de los antioxidantes se pueden prevenir o disminuir la causa de ciertos padecimientos que desencadenan enfermedades.

Los primeros registros del uso de orquideas en México, se encuentran en el manuscrito Azteca escrito en 1522, titulado Libellus de Medicinalibus Indorum Herbes (Hernandez, 1959), quién menciona la utilización de la vainilla (*Vanilla planifolia)* como perfume y saborizante. *Vanilla planifolia* era utilizada también por los Aztecas para el tratamiento de

la histeria, fiebre, impotencia, reumatismo y para incrementar la energía del sistema muscular. Otras orquideas empleadas en tiempos prehispánicos eran: *Prosthechea citrina* para las infecciones; *Laelia autumnalis* para la tos; *Stanhopea hernandezii* para la deshidratación; *Arpophyllum spicatum, Bletia catenulata, Epidendrum pastoris y Cranichis speciosa* para la disentería.

Actualmente en la medicina tradicional mexicana *Laelia anceps*, *L. autumnalis, Prosthechea karwinskii, Cyrtopodium punctatum*, *Myrmecophila christinae* y *Rhyncholaelia digbyana* se emplea para curar heridas y quemaduras, ayudan en las labores de parto y previenen los abortos involuntarios (Cruz *et al*., 2014; Salazar *et al*., 2007; Vergara *et al*., 2010, Vergara *et al.,* 2008); *P. michuacana* es utilizado como un antiinflamatorio de riñones, depurativo y calmante (Cervantes-Reyes, 2008 y Neira, 2009) y *Catasetum integerrimum* es utilizada para la cura de tumores (Cox, 2013). En el sur de África en la medicina tradicional las orquideas se emplean para el tratamiento de ciertos padecimientos desencadenados por la inflamación como dolor muscular, artritis, tumores, reumatismo, asma, heridas y llagas (Musharof, 2011 y Chinsamy *et al*. 2014).

Investigaciones recientes *in vivo* e *in vitro* validan el uso de las orquideas para la cura de ciertos padecimientos relacionados con la inflamación. *Dendrobium speciosum* (Lo *et al.,* 2004) y *P. michuacana* (Cervantes-Reyes, 2008) han demostrado tener fuerte actividad antioxidante; está ultima también demostró actividad cicatrizante y efecto hepatoprotectivo sobre el daño hepático (Pérez *et al*., 2011), *Scaphyglottis livida* (Hossain, 2011) y *L. autumnalis* (Vergara *et al.,* 2008) presentó potencial actividad vasorelajante de contracciones del corazón y antihipertensiva sobre el canal de calcio (Vergara *et al.,* 2008), *Encyclia michuacana* presentó efecto antiespasmódico (Pérez *et al*., 2009), *Laelia anceps* (Jimarez-Montiel, 2009), *Oncidium sphacelatum* (Hernández-Galicia, 2010), *Eulophia ochreata* (Jagtap et al., 2009; Rajendra *et al.,* 2010) y *Gastrodia elata* (Lee *et al*., 2006) han

demostrado tener un potente efecto antiinflamatorio. L. anceps presentó un 77.3% de inhibición de la inflamación, además un 93.19% de inhibición en la línea celular de cáncer de mama, *E. ochreata* disminuyó el edema de inflamación en un 48 y 53% en dosis de 500 y 1000 µg/kg y *O. sphacelatum* inhibió el crecimiento celular de las líneas de cáncer humano de próstata, leucemia, colon y mama.

Los compuestos naturales identificados en las diferentes especies de orquideas que han presentado actividad antiinflamatoria son principalmente polifenoles como el flavonol 5-hidroxi, 3,7,4´- trimetoxiflavonol en *L. anceps* (Jimarez-Montiel, 2009); fenantrenos, binenziles, fluorenonas, sesquiterpenos y alcaloides en *D. speciosum* (Lo *et al.,* 2004); Estilbenoides como el gigantol (Hossain, 2011) y el fenantreno 3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenantrene (Estrada *et al*., 2006) en *S. livida;* el gigantol 3´,4 – Dihidroxi – 5,5´-dimetoxibibencil; 7, metoxi-scutillarein y taxifolin (Jimarez-Montiel, 2009) en *P. michuacana* los flavonoides scutellarein 6-methyl ether, dihydroquercetin, apigenin 7-O-glucoside, apigenin-7-neohesperidoside y apigenin-6-O-β-D-glucopyranosil-3-O-α-L-rhamnopyranoside en la misma especie (Pérez *et al*., 2011); la flavonona 5,6-diacetato-4´-metoxi-7-O-acetilrutinosidoflavanona acetato de pectolinarina, β-sitosterol en *O. sphacelatum* (Hernández-Galicia, 2010); fenantrenos como 9,10-Dihydro-2,5-Dimethoxyphenanthrene-1,7-diol; 3,7-Dihydroxy-2,4-Dimethoxyphenanthrene y flavonoides como el flavanthridin, eulophiol, scutellarein 6-methyl ether, dihydroquercetin, apigenin 7-O-glucoside, apigenin-7-neohesperidoside y apigenin-6-O-β-D-glucopyranosil-3-O-α-L-rhamnopyranoside en *Eulophia ochreata* (Jagtap *et al*., 2009; Yogesh *et al*., 2013) y los polifenoles 4-hydroxybenzaldehyde, 4-hydroxybenzyl alcohol, benzyl alcohol, bis-(4-hydroxyphenyl) methane, 4(4'-hydroxybenzyloxy)benzyl methylether, 4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde y 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid en *Gastrodia elata* (Lee *et al*., 2006).

A los metabolitos secundarios como saponinas, fenoles del tipo flavonoide, fenilpropanoides, taninos, alcaloides y terpenos (Newman *et al*., 2003; Sánchez *et al*., 2014; Setty y Sigal, 2005) de las plantas se les atribuyen diversas actividades biológicas, entre ellas la capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Halliwell *et al*., 2005; Wiart, 2007; Carlsen *et al*., 2010, Gerritsen *et al*., 1995).

Otras plantas han presentado fuerte actividad antioxidante y potente actividad antiinflamatoria evaluadas en el modelo de carragenina, como en *Potentilla repants* que inhibió el edema en un 26.62 y 61.37% (Tomovic *et al*., 2015), *Millettia pulchra* inhibió un 31.1 a 52.9% (Huo *et al*., 2015), *Plumbago zeylanica, Terminalia bellarica* y *T. chebulla* inhibieron la inflamación en un 23.48, 32.85 y 34.28%, respectivamente (Rafik *et al*., 2015); *Thymus sephyllum* produjo un efecto antiinflamatorio del 34% (Alamgeer *et al*., 2015), *Piper umbellatum* inhibió la inflamación en un 35.6, 79.7 y 82.4% en dosis dependientes (Hespporte *et al*., 2015), *Chiliotrichum diffusum* inhibío la inflamación hasta un 56% (Alcalde *et al*., 2013). *Macrosiphonia longiflora* presentó un 26.1 % de anti inflamación (Da silva *et al*., 2014), *Annona muricata* produjó un efecto de 71,12% (Poma *et al*., 2011), *Erica arbórea* la dosis mas alto produjó un 36.9% (Amezouar *et al*., 2013) y *Jungia rugosa* presentó un efecto antiinflamatorio de 43.8% (Enciso, 2011).

Los principales compuestos mayoritarios que se han identificado en especies vegetales a través de herramientos de análisis por el método HPLC, a los cuales se les ha atribuido la actividad antioxidante y antiinflamatoria son principalmente polifenoles. Especificamente son acido galico, catequina, acido protocatequina, epicatequin, luteolin-7-O-glucoside, quercetina, acido cafeico, acido p-cumarico, quercetin-3-O-glucoside, rutin, kaemferol-3-O-glucoside, apigenin-7-Oglucoside y kaemferol (Tomovic *et al*., 2015; Alamgeer *et al*., 2015; Alcalde *et al*., 2013); ovalitenin B, ovalitenin A, lanceolatin B y 2",2"-dimethylpyrano-[5",6":7,8]-flavone (Huo *et al*., 2015); 4-nerolidylcatechol (Hespporte *et al*., 2015); Riparin II

(O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) (Rodriguez *et al*., 2013), cumarinas (Özlem *et al*., 2011), Chalcona y flavonas (Alberto *et al*., 2007); 2´-hydroxychalcones, 2´-methoxychalcones (Sameena *et al*., 2013); Una mezcla de flavonoides como silymarina, luteolina y lignanos como salvina y calocedrina dihidrobenzofuran-neolignanos, woorenosidos (I-V)., pinoresinol, woorenosido V y lariciresinol glicósido (Manna *et al*., 1999; Xagorari *et al*., 2001; Wadsworth *et al*., 2001 y Cho *et al*., 1998, 2000, 2001), geraniina, corilagina y Hipericina (Kang *et al.,* 2001).

1.5 LITERATURA CITADA

Alamgeer U.M., Muhammad N.M., Hafeez U.K., Zafirah M., Muhammad N.H.M., Taseer A., Fouzia L., Nazia T., Abdul Q.K., Haseeb A., Wasim K., Ibrahim J and Hader A. 2015. Evaluation of anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of Thimus serphyllum Linn. In mice. Natural Drugs.vol. 72:1, pp 113-118.

Alberto MR, Nieva MIM, Zampini IC, Isla MI. 2007. Actividad antiinflamatoria de flavonoides naturales estructuralmente relacionados. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6:313-314

Alcalde, S.M. B., Flores, M.L., Cordoba, O.L., Taira, C.A. y Gorzalczany. 2013. Antinociceptive and anti-in fl ammatory activities of an aqueous extract of Chiliotrichum diffusum. Revista Brasileira de Farmacognosia. 23(4):699-705.

Amezouar F, Badri W, Hsaine M, Bourhim N & Fougrach H. 2013. Évaluation des activités antioxidante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. Pathologie Biologie 61:254-258.

Andrzej L.D., Dorota W. and Malgorzata O. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). Food Chemistry. 131:1037-1043.

Banafsheh Amir Aslani y Sirous Ghobadi. 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the inmune system. Life sciences. 146:163-173.

Bermúdez, A., Olivira, M.M.A. y Velásquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus enfoques actuales. Interciencia. 30:453-459.

Carlsen, H. M.; Halvorsen, B. L. Holte, K.; Bohn, S. K.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; Barikmo, I. E.; Berhe, N.; Willett, W. C.; Phillips, K. M.; Jacobs, D. R. and Blomhoff, R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. Nutr. J. 9:3-13.

Cervantes- Reyes, M.A. (2008). Evaluación farmacológica de *Prosthechea michuacana* (*Orchidaceae*), especie de potencial agronómico. Presentado el 26 de Noviembre del 2008 en el CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca.

Chinsamy, M., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2014. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterasa activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. South African Journal of Botany. 91. 88-89.

Cho JY, Park J, Kim PS, Yoo ES, Baik KU, Park MH.2001. Savinin, a lignan from Pterocarpus santalinus inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation. Biol Pharm Bull 24: 167 - 171.

Cho JY, Park J, Yoo ES, Yoshikawa KU, Baik K, Lee J, Park MH. 1998. Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of Coptis japonica var. Dissecta on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. Arch Pharm Res 21: 12 - 16.

Cox, L.D. T. 2013. Orquideas: Importancia y uso en México. Bioagrociencias. Vol. 6:2. 4-7.

Cruz, G.G., Solano, G.R. y Lagunez, R.L. 2014. Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico. Brazilian Journak of Pharmacognosy. 24. 153-158.

Cruz-Garcia, G., Lagunez-Rivera, L., Chavez-Angeles, M.G. y Solano-Gomez, R. 2015. The Wild Orchid Trade in a Mexican Local Market: Diversity and Economics. Economic Botany. DOI 10.1007/s12231-015-9321-z

Cy, N.R., M.I. Singk, L.L. Achlluredy, H.N. Nigg, S. Nagy. 1985. Isolation and partial characterization of phytotoxic compounds from lantana (*Iriana cámara L.*) Journal of Chem. Ecol: 11(8); 979-988.

da Silva, A.O., Damaceno, A.A., Almeida, D.A., Balogun, S.O., de Oliveira, R.G., Aires, A.A., Soares, I.M., Marson, A.P.,Ascéncio, S.D. y de Oliveira, M.D.T. 2014. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of Macrosiphonia longiflora (Desf.) Müll.Arg. Journal of etnhopharmacology. 154: 319-329.

Deanne, J. B., 2005. Vainilla as a Medicinal Plant. Semin Integr Med. 3:129-131

Enciso, E & Arroyo, J. 2011. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac med,* 72(4): 231-7.

Foti, M. C; Daquino, C; Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem,* 69: 2309-2314.

Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA. 1995. Flavonoids Inhibit Cytokine-induced Endothelial Cell Adhesion Protein Gene Expression. Am J Pathol 147: 278 – 292

Hagsater, E., Soto-Arenas, M.A., Salazar, G., Jiménez-Machorro, R., Lopez-Rosas, M., Dressler, R.L., 2005. Las Orquideas de México. Redacta, México.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 1999.

Hernandez, F,. 1959. Historia Natual de Nueva España. Obras Completas, tomo II y III. Universidad Nacional Autonoma de México, México.

Hernández- Galicia, G. (2010). Fitoquímica y evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de extractos orgánicos y compuestos aislados de hojas de *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae). Presentado en Mayo del 2010 en la UNAM, México.

Hespporte L.I., Barbosa D.V-C., Araújo P.M., Gois A.L.T.R., de Oliveira I.M.S., Ann M.F., de Carvalho J.E. y Ferreira R.A.R. 2015. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromhetane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. Hindawi.vol. 2015, article ID 948737, 8 pages. Doi.org/10.1155/2015/948737.

Hossain, M. M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances — An overview. *Fitoterapia,* 82:102–140.

Huo X., Zhang L., Gao L., Guo Y., Zhang L., Li L., Si J. y Cao Li. 2015. Antiinflamatory and analgesic activities of etanol extract and isolated compounds from *Millettia pulchra*. Biological and pharmaceutical. DOI:10.1248/bpb.b15-00187.

Jagtap, S. Gilda, P. Bhondave, A. Pradkar, P. Pawar, A. Harsulkar. 2009. Validation of the potential of Eulophia ochreata L. tubers for its anti-inflammatory and antioxidant activity. Pharmacologyonline 2; 307-316.

Jimarez-Montiel, M.J. 2009. Fitoquímica y determinación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de compuestos y extractos orgánicos de las hojas de *Laelia anceps* (Orchidaceae). Presentado en Junio 2009 en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, México D.F.

Kang BY, Chung SW, Kim TS. 2001. Inhibition of interleukin-2 production in lipopolysaccha- ride-activated mouse macrophages by hypericin, an active component of Hypericum perforatum .Planta Medica 67: 364 - 366.

Lee J.Y, Jang Y.W, Kang H.S, Moon H, Sim S.S y Kim C.J. 2006. Anti-inflammatory action of phenolic compounds from Gastrodia elata root. Arch Pharm Res. 10: 849-58.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. 1999. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. J Immunology 163: 6800 - 6809.

Md, N. A; Nusrat, J. B; Md, R. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidan activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002

Musharof, H. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances- An overview. Fitoterapia. 82: 102-140.

Neira, A.M.G. 2009. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana.* Instituto Politécnico Nacional.

Neira, A.M.G. 2009. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana.* Instituto Politécnico Nacional.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. J Nat Prod 66: 1022 - 1037.

Ozcelik, B; Lee, J. H; Min, D. B. (2003). Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science,* 68: 487–490.

Özlem B, Gülcin SC, Hanefi Ö, Stefano DA, Jan H and Karel ¨S. 2011. Hepatoprotective and TNF-a inhibitory activity of Zosima absinthifolia extracts and coumarins. Fitoterapia. 82:454-459

Perez, M. G. R. y Vargas, R.S. 2009. Anti-inflammatory and wound healing potential of Prosthechea michuacana in rats. Pharmacognosy Magazine. 5. Pp 219-225.

Poma EM, Requis ER, Gordillo GC y Fuertes CM. 2011. Phytochemical study and anti-inflammatory activity *Annona muricata* L. (Soursop) from Cuzco. Ciencia e Investigación. 14(2):29-33

Quintanar- Escorza, M.A & Calderón-Salinas, J.V. 2009. La capacidad antioxidante total. bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3): 89-101.

Rafik US, Mahehs MP & Rajesh NG. 2015. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system *in vitro* as well as *in vivo*. Journal of Traditional and Complementary Medicine xxx: 1-7

Rajendra D. Kshirsagar, Yogesh B. Kanekar, Suresh D. Jagtap, Shakti N. Upadhyay, Rajesh Rao, Sandip P. Bhujbal, Jagdish N. Kedia. 2010. Phenanthrenes of Eulophia ochreata Lindl. International Journal of Green Pharmacy.

Rodrigues AMdeC, Nayrton FMR, Freire LV, Vasconcelos ERR, Leite MD, Gomes MIS, de Franca MMF, Barbosa JMF, Chavez SJG, Florenco FCdeS. 2013. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxy-benzoyl tyramine) in animal models. Chemico-Biological Interactions 205: 165-172.

Salazar-Rojas, V. M.; Herrera-Cabrera, B. E.; Flores, Palacios, A. y Ocampo-Fletes, I. 2007. Uso tradicional y conservación de la "calaverita" *Laelia aceps subsp. Dawson* ii F. Chilapensis Soto- Arenas en la región de Chilapa, Guerrero. Costa Rica. Lankesteriana. 7(1-2):368-370.

Sameena B, Kalim J, Shamim A, Rathish IG, Surender S, Chaitanya M, Arunasree KM and Alam MS. 2013. Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. European Journal of Medicinal Chemistry. 65:51-59

Sanchez PWF, Pérez JCC, Méndez AJJ, Murillo AW, Ospina GLF. 2014. Caracterizacion química preliminary evaluacion de la actividad antioxidante in vitro y antiinflamatoria in vivo de los extractos y fracciones de diferente polaridad de Mollinedia racemosa (Romadizo). Vitae, 21: s75-s76

Setty AR, Sigal LH. 2005. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. Semminars Arthritis Rheum 34: 773 - 784.

Sharma, O.P & Bhat, T.K . (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry,* 113; 1202–1205.

Soto Arenas, G.A., Salazar-Chávez .R. Jiménez Machorro Boletín de la Sociedad Botánica de México, núm. 78, junio, 2006, pp. 121-124, Sociedad Botánica de México México

Tomovic M.T., Cupara S.M., Popovic M.T., Ljujic B.T., Kostic M.J. y Jankovic S.M. 2015. Antioxidant and anti-inflamatory activity of *Potentilla reptans L*. Poloniae Pharmaceutica. 72: 137-145.

Vanhaelen, M., J. Lejoly, M. Hanocq, L. Molle. 1991. Cümatic and geographical aspects of medicinal plant constituents. In The medicinal plant industry. De. By R.O.B. Wijesekera. Florida, CRC press. Pp. 59-76.

Vergara, J.G., Rolffy, O. A., Patricia, C.E., Ibarra, M.B., Itzel, G.O., Villalobos, R.M. y Estrada, S.S. 2008. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium cannel blockade. Vascular Pharmacologhy. 49. 26-31.

Vergara, J.G., Rolffy, O. A., Rivera, J.L., Patricia, C.E., Ibarra, M.B., Villalobos, R.M., Itzel, G.O. y Estrada, S.S. 2010. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of Laelia anceps are mediated by calcicum-channel antagonism. Fitoterapia. 8 . 350-357.

Wadsworth TL, McDonald TL, Koop DR. 2001. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lypopolysaccharide-induced signalling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. Biochem Pharmacol 62: 963 - 974.

Wagner H and Bladt S. Plan Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. 2ª.ed. 2001.

Wiart, C. 2007. Anti-inflammatory plants. In: ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific. Ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Chapter 1. 1-56 pp

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. 2001. Luteolin inhibits and endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflamma- tory cytokine production in macrophages. J Pharmacol Exp Ther 296: 181 - 187.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1Objetivo general

Extraer, cuantificar y determinar los compuestos fenólicos presentes en el extracto obtenido a partir de *Laelia furfuracea* y evaluar su actividad antiinflamatoria en modelo murino.

1.6.2 Objetivos específicos

a) Extraer los compuestos fenólicos de hojas, flores y pseudobulbos de *Laelia furfuracea*
b) Cuantificar fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante en hojas, flores y pseudobulbos de los extractos obtenidos de *Laelia furfuracea*
c) Evaluar en modelo murino la actividad antiinflamatoria del extracto hidroetanólico y de fracciones de hojas con mayor contenido fenólico de *Laelia furfuracea*
d) Identificar los compuestos fenólicos en el extracto que presentó actividad antiinflamatoria en modelo murino a través de Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

1.7 HIPOTESIS

El extracto hidroetanólico de flores, hojas y pseudobulbos de *Laelia furfuracea* con mayor índice de actividad antioxidante, el mayor contenido de fenoles totales y flavonoides totales, será el que presente mayor actividad antiinflamatoria al grupo control e igual o menor que el fármaco de referencia.

CAPITULO II
MARCO REFERENCIAL

2.1 LAS PLANTAS EN LA MEDICINA

2.1.1 Los productos naturales en la farmacología

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para

propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estas plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima en la fabricación de medicamentos sintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos pueden servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Bermúdez *et al*., 2005).

Los productos naturales ofrecen una gran diversidad química incomparable con la complejidad estructural y la potencia biológica. Ocupan una región complementaria en el campo de la química farmacéutica comparada con los compuestos de origen sintético. Además de que los productos naturales pueden ser utilizados como medicamentos o plantillas para la producción de medicamentos, también tienen una gran utilidad en el estudio de los blancos moleculares y fisiopatologías de diferentes enfermedades, lo cual se ve reflejado en un mejor entendimiento de estos procesos.

La incorporación y utilización de las plantas medicinales en el tratamiento de diversas reacciones inflamatorias, en particular el reumatismo, son prácticas comunes en la medicina tradicional. Hoy día es evidente que el interés por las sustancias anti- inflamatorias de origen vegetal va en aumento, porque ofrecen en algunos casos ventajas en relación a los anti-inflamatorios clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios.

Se ha reportado que algunos productos naturales presentan efectos sobre la expresión de: citoquinas proinflamatorias como interleuquinas (IL-1b, IL-6, IL-8), factor estimulante de colonias-granulocito/macrófago (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF-), enzimas mediadoras como la Metaloproteinasa (MMP-3 y MMP-13), Isoforma inducible de la oxido nítrico sintasa (iNOS) y enzima ciclooxigenasa (COX-2); y catabolitos oxido nítrico (NO) y la prostaglandina 2 (PGE2). Esta actividad ha sido asociada con: la inactivación del Factor

de transcripción nuclear-B (NF- kB), por la prevención de la fosforilación- degradación de Proteina inhibidora de NF-$_K$B (IkB) o la regulación de ciertos factores de trascripción, entre otros, lo cual constituye el mecanismo de acción de tales compuestos (Gilmore, 2006).

2.1.2 Metabolitos secundarios en las plantas

Los metabolitos secundarios se definen como, sustancias químicas sintetizadas por los diferentes grupos de plantas, los cuales no participan directamente en actividades bioquímicas primarias o vitales para las plantas (Vanhaelen *et a*l., 1991).

Los metabolitos desempeñan roles importantes en la ecología vegetal, por ejemplo algunos compuestos fenólicos y terpenoides, funcionan como insecticidas o repelentes de organismos herbívoros, así como hormonas de insectos, fitoalexinas, agentes alelopáticos, reguladores del crecimiento vegetal, también poseen actividad fungicida o afectan en varios modos a organismos patógenos como los nematodos (Cy *et al*., 1985).

Adicionalmente, al progreso en la ecología química, el campo emergente de la evolución molecular ha proporcionado evidencia crucial que postula que el proceso evolutivo del metabolismo secundario, se debe a que algunas de las enzimas del metabolismo primario fueron duplicadas, reclutadas y diversificadas para cumplir nuevas funciones como respuesta a la presión de la selección natural (Hartman, 2007). Y que estas sirven para la salud, y es así como se utilizan un gran número de plantas medicinales en todo el mundo.

Sus aplicaciones, muy variadas, hacen del fenol una materia prima clave de la industria química orgánica: en la terapéutica se usa para preparar medicamentos, en particular derivados del ácido salicílico, de los cuales algunos se emplean en la perfumería. Las industrias de materias plásticas (fenoplastos) y de textiles artificiales (nylon y perlón). En la refinación del petróleo (Rakoff & Norman, 2005), Se emplea también en la fabricación de

materias colorantes, detergentes, taninos sintéticos, insecticidas, herbicidas, hormona vegetales, etc. (Devoré, 1959).

2.2 Extracción convencional sólido-líquido

Existen diferentes métodos de extracción de los productos de origen natural. El método empleado para extracción dependerá de los compuestos a extraer y los objetivos de investigación.

La extracción se define como la acción de separar con un líquido una fracción especifica de una muestra. La extracción se puede realizar desde los tres estados de la materia sólido-liquido, líquido-líquido y gas-liquido.

Para la extracción de los componentes en las plantas existen varios métodos de extracción convencional como maceración, hidrodestilación y por soxhlet. La extracción por soxhlet es un método muy empleado, y este método es de fase solido- liquido, donde el hexano es uno de los solventes más utilizados, representa una desventaja con los compuestos de menor polaridad, por lo que tienden a utilizar co-solventes de isopropanol con hexano y estos representan costos elevados. Los tiempos de extracción pueden durar hasta dos horas, por lo que se requiere de una mayor agitación, lo que ocasiona que los componentes de la mezcla se oxiden más rápido. El extracto no requiere de un proceso de filtración por lo que es el método más simple y más barato (Lijun y Weller, 2006). La muestra entra en contacto con el solvente, por lo que cambia la posición de los analitos dentro de la mezcla. La temperatura del sistema es mayor que la temperatura ambiente por lo que la extracción es más rápida (Luque, 2004).

La extracción con solventes de muestras sólidas, es comúnmente conocida como extracción solido-liquido (Luque de castro y García, 1998).

La extracción de solido-liquido es una técnica de extracción muy antigua, existen datos que en Mesopotamia hace aproximadamente 3500 años A.C. se realizaba la extracción con calor-agua para la materia orgánica. La extracción Soxhlet ha sido una técnica utilizada por mucho tiempo (Luque de Castro y Garcia, 1998). El equipo de extracción de laboratorio Soxhlet fue propuesto en 1879 principalmente para la determinación de la grasa en la leche (Jensen, 2007).

Lo que hace el extractor Soxhlet es realizar un sinfín número de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material (Nuñez, 2008). El principio es que la muestra es previamente molida y colocada dentro de un cartucho poroso y puesta en la cámara de extracción, el solvente es colocado en el matraz al cual se le aplica calor. La destilación del solvente en forma de vapor pasa por el tubo de vidrio que lleva al refrigerante que condensa el vapor (Luque de Castro y Garcia, 1998). El solvente en estado liquido cae sobre el cartucho de la materia prima llevando a cabo la extracción de los compuestos hasta el nivel de la cámara de extracción que por diferencia de presiones comienza el sifón arrastrando con ello los compuestos del extracto al matraz de vidrio que contiene el solvente (Luque de Castro y Garcia, 1998). El incremento en las polaridades del sistema (incluyendo solventes, análisis y mezclas) incrementan la eficiencia, que pueden superar o mejorar lo obtenido por Soxhlet. Se emplea un co-solvente para incrementar las polaridades de la fase liquida.

2.3 Las orquideas

La familia Orchidaceae es una de las más extensas del mundo. Actualmente se han identificado más de 750 a 850 géneros, con 25,000 a 35 000 especies (Dressler, 1993. Citado en Musharof, 2011), que están ampliamente distribuidas en todos los ecosistemas excepto en la Antártida y en zonas desérticas.

2.3.1 El género Laelia

El género *Laelia*, debe su nombre a una de las vírgenes del templo de Vesta de la mitología Griega. El género *Laelia* fue establecido en 1831 por el Botánico Ingles John Lindley.

Las especies de este género se distribuyen principalmente en México y algunas especies en el norte de Centroamérica como Guatemala y Honduras. La distribución de las Laelias en México es desde las zonas montañosas en el oeste del país en la Sierra Madre Occidental, en el Neovolcánico Transversal y en la Sierra Madre del Sur. En el Golfo de México y en la Sierra Madre Oriental (Halbinger and Soto, 1997).

El género está formado por once especies, una de ellas con dos subespecies: *L. albida, L. anceps* (con las subespecies *anceps* y *dawsonii*), *L. aurea, L. autumnalis, L. crawshayana, L. eyermaniana, L. furfuracea, L. gouldiana, L. rubescens, L. speciosa y L. superbiens*.

Desde hace casi dos siglos las Laelias han sido ampliamente cultivadas en México y en el extranjero. Son sin duda, las orquídeas mexicanas más destacadas y requeridas. Tradicionalmente se han utilizado por grupos indígenas durante siglos como plantas de ornato y como adornos durante las festividades religiosas. *Laelia anceps, Laelia gouldiana, Laelia autumnalis y Laelia furfuracea* se usan para hacer ofrendas en las festividades de Día de Muertos, de ahí los nombres comunes de algunas especies: flor de muerto, flor de las ánimas, calaverita, lirio de todo santos, etc. (Salazar *et al*., 2007).

2.3.2 *Laelia furfuracea*

El nombre específico de esta orquídea, *furfuraceus* (casposa), hace referencia a las pequeñas escamas de color marrón o negro oscuro que cubren el ovario de la flor. Fue descubierta por el conde Karwinsky en 1832 y luego introducida a Inglaterra en 1838 para su cultivo.

Es una especie endémica de Oaxaca, donde se distribuye en la Mixteca, las montañas y laderas subhúmedas de los Valles Centrales (García *et al*., 2004). Localmente es conocida con los nombres de “Lirio de San Francisco”, “monja” e “Ita chaca” (flor de plástico) o “Ita ndaka” en Mixteco. Su floración ocurre entre octubre y diciembre.

Laelia furfuracea es una hierba epífita, con pseudobulbos oblongos-ovoides de 5.3 cm de alto los cuales presentan sulcos longitudinales cuando éstos empiezan a deshidratarse; presenta una sola hoja apical, lanceolada, corácea, de 5 a 12 cm de largo; la inflorescencia mide de 25 a 35 cm de alto, presenta de 1 a 3 flores las cuales miden de 7 a 9 cm de diámetro; la coloración de los sépalos y pétalos varía de rosa pálido a rosa magenta, aunque en ocasiones pueden ser blancos, el labelo es de color similar o un color más oscuro.

2.3.3 Los fitoquímicos en las orquideas

Las Orquideas, al igual que otras plantas, producen un gran número de fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, carotenoides, antocianinas y esteroles, de los cuales han sido escasamente investigadas su función biológica. Los alcaloides y flavonoides son los más importantes por su actividad biológica (Musharof, 2011).

Los primeros alcaloides estudiados en orquideas fueron en 1892 por E. Wildeman de unas especies de europeas. En 1896 E. de Droog analizo 104 especies y en 1890 E. Boorsma detecto alcaloides en las especies *Paphiopedilum javanicum* y *Liparis parviflora*. Los primeros alcaloides aislados fue dendrobine de *Dendrobium nobile* en 1932 (Bhattacharjee, 2006).

2.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es primordial en el desarrollo de enfermedades humanas (Rajendran et al., 2014). Son importantes en términos de su habilidad para proteger el inicio del daño

celular oxidativo que pueden dar condiciones como, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, pérdida de memoria, depresión y enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, enfermedad cardiaca isquémica, hipertrofia cardiaca, shock y trauma, así como, hipertensión, también está implicado en desordenes pulmonares que incluyen enfermedad inflamatoria como es asma y enfermedad pulmonar obstruciva crónica (EPOC). Y adicionalmente enfermedades asociadas con infantes prematuros como la displacia broncopulmonar, leucomalacia periventricular, hemorragia intraventricular, retinopatía de prematuros, y enterocoitis necrosante, en varias enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y también en desordenes renal severo como la glomerulonefritis, nefritis túbulo intersticial, falla renal crónica, proteinuria, uremia y finalmente enfermedades gastrointestinales como ulcera péptica, enfermedad inflamatoria del intestino y colitis, diabetes, tumor y cáncer (Goodman, 2001).

2.4.1 Radicales libres y especies reactivas

Los radicales libres se describen como moléculas altamente reactivas que contienen uno o más electrones impares fuera de su órbita. Los radicales libres son originados de oxigeno, nitrógeno y sulfuro; dando especies reactivas del oxigeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de sulfuro (RSS) (Banafsheh *et al*., 2016).

La actividad de algunas enzimas incluyendo oxidasas, ciclooxigenasas, lipooxigenasas, deshidrogenasas y peroxidasas podría resultar en la producción de radicales libres. Pero altas concentraciones de radicales libres resulta en estrés oxidativo, un proceso deletéreo que puede causar daño a todo tipo de biomoléculas presentes en el cuerpo, incluyendo proteínas, enzimas, aminoácidos, lípidos, DNA y carbohidratos (Banafsheh *et al*., 2016).

Las especies reactivas de oxigeno (ERO) incluyen peróxido de hidrogeno, acido hipocloroso, anión superóxido, oxigeno singlete, peróxidos lipídicos, radicales hipocloricos

e hidroxilos están involucradas en el desarrollo, diferenciación, progresión y muerte de la célula. Reaccionan con lípidos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y otras pequeñas moléculas. Bajas concentraciones de ERO juegan un rol indispensable en la señalización intracelular y también en la defensa de patógenos. Altas concentraciones juegan un rol en muchas enfermedades del humano. Los antioxidantes presumiblemente actúan como un protector al inicio de la acumulación de ERO y su eliminación del sistema (Perayaman *et al*., 2014)

2.4.2 Antioxidantes como sistema de defensa

Los sistemas biológicos son equipados con sistemas antioxidantes altamente protectivos, siendo efectivos al neutralizar el exceso de radicales libres y proteger a la celula de efectos perjudiciales (Banafsheh *et al*., 2016). Los antioxidantes se definen como las sustancias que en pequeñas concentraciones inhiben significativamente o retardan los procesos oxidativos (Dinstel *et al*., 2013).

Los antioxidantes enzimáticos previenen la formación o neutralizan los radicales libres siendo el glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), superoxido dismutasa (SOD) y peroxiredoxin (Prxs) (Rahman, 2007; Pham et al., 2008; Young & Woodside, 2001). Los antioxidantes no enzimáticos como glutatión (GSH) reduce la glutatión oxidada (GSSG) (Rahman, 2007), el sistema tioredoxin, sistema glutaredoxin, acido lipoico (ALA) (Rahman, 2007), melatonin, coenzima Q10.

Los nutrientes antioxidantes son compuestos exógenos, obtenidos de alimentos naturales de suplementos de la dieta como vitamina C, E, carotenoides, elementos traza (Se, Zn y sulfuro) y polifenoles (Rahman, 2007; Pandey *et al.,* 2009; Rao *et al.,* 2007).

Los polifenoles son metabolitos secundarios naturales de las plantas responsables de la protección de la radicación UV y ataque de patógenos. Ayudan a proteger a la celula del daño oxidativo y reduce el riesgo de desordenes degenerativos (Banafsheh *et al*., 2016).

Los polifenoles se clasifican en diferentes categorías como acidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Wagner y Bladt, 2001). Los polifenoles más importantes son los flavonoides que son sintetizados por las plantas del aminoácido aromatico fenilalanina, tirosina y malonato. Los flavonoides se clasifican en seis subclases incluyendo flavonoles, flavononas, flavonas, isoflavonas y antocianinas (Banafsheh *et al*., 2016).

2.5 Inflamación

La inflamación fue descrita por Celsus en el año 10 antes de Cristo, Eming *et al*., (2007) la describe como un proceso fisiológico que protege a los organismos de daños causados por agentes biológicos, físicos o químicos (quemaduras, infecciones, químicos tóxicos, alergias y otros estímulos), está caracterizado por un incremento en el flujo sanguíneo, la migración de leucocitos de la sangre al tejido dañado y la iniciación de eventos bioquímicos que propagan la respuesta inflamatoria.

A nivel macroscópico, la respuesta inflamatoria esta usualmente acompañada por conocidos signos clínicos como tumefacción (edema), rubor, calor, dolor espontáneo a la palpación y desorden de la función tisular. La respuesta inflamatoria ocurre en tres fases distintas, cada una mediada aparentemente por diferentes mecanismos: a) Una fase transitoria aguda, caracterizada por vasodilatación local, hiperemia activa e incremento en la permeabilidad capilar, b) Una fase subaguda tardía, visiblemente caracterizada por un periodo de hiperemia pasiva, infiltración de leucocitos y fagocitos y, c) una fase proliferativa crónica, en la cual ocurre degeneración de tejidos, lesión endotelial y fibrosis (Fridovich, 1997).

Numerosas enzimas y mediadores son involucrados en el proceso inflamatorio. Los mediadores pertenecen a diferentes clases químicas, tales como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, factores de crecimiento, factores activadores de colonia, factores de complemento, anticuerpos, quininas), especies reactivas de oxígeno (ROS, anión superóxido, hidroperóxido, radicales hidroxilos), y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoides, leucotrienos). Estos mediadores inician, mantienen, agravan y modulan el curso de un gran número de enfermedades humanas (Gómez *et al*., 2011).

Además de un enorme número de mediadores proinflamatorios, la complejidad de tales procesos son incrementados adicionalmente por la participación de mecanismos antiflogísticos e inmunomodulatorios (ej. la liberación de esteroides antiinflamatorios e inmunosupresivos de la corteza adrenal) y por el hecho que entre una clase de mediadores algunos miembros podrían actuar de forma antiinflamatoria: ej. el ácido 15-R-hidroxieicosatetraenóico (15(R)-HETE) y lipoxinas de los productos de la cascada del ácido araquidónico o la interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12 e IL-13 de la familia de citoquinas, las cuales ejercen acciones pro y antiiflamatorias dependiendo de su participación en la respuesta inmunoespecífica (Gilmore, 2006; Safayhi y Sailer, 1997).

2.5.1 Células que participan en el proceso inflamatorio

Las prostaglandinas (PGA, PGB, PGC, PGFα, PGG y PGI) son reguladoras del crecimiento celular. Se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como las ciclooxigenazas (COX-1, COX-2 y COX-3) (Gómez *et al*., 2011).

La enzima COX-1 se expresa de manera constitutiva en casi todas las células. La enzima COX-2 no se encuentra normalmente pero pueden ser inducida por estímulos proinflamatorios, algunos factores séricos, citocinas y factores de crecimiento y se

considera que es principalmente responsable de la síntesis de los mediadores prostanoides del dolor, la inflamación y la fiebre, efecto que es inhibido por la administración de glucocorticoides (GCs) como la dexametasona. Por otro lado la enzima COX-3, una isoforma de la COX- 1, conocida con el nombre de la COX-1b o variante de la COX-1 (COX-1v), al parecer juega un papel en el proceso antiinflamatorio y su inhibición explicaría el alivio del dolor y la reducción de la fiebre producida por los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs). Las COXs poseen dos actividades diferentes: una de sintasa de endoperóxido que oxigena y produce una estructura en anillo, en el ácido graso precursor para formar endoperóxido cíclico de PGG1, y una actividad de peroxidasa que transforma la PGG1 en PGH1. Las PGG1 y PGH1 son muy inestables, por acción enzimática se transforman en PGI, tromboxano (TXA), PGE, PGF y PGD (Bergström et al., 1963; Funk, 2001).

Las citoquinas representan un grupo multifuncional de sustancias mensajeras que transportan información de una célula a otra, responsable de la inducción de varias enzimas, como por ejemplo la óxido nítrico sintetasa (NOS) y la COX- 2. Pertenecen a una familia de proteínas secretadas por las células de inmunidad innata y adaptativa que median muchas de sus funciones. Las citoquinas pueden ser clasificadas como pro o antiinflamatorias dependiendo de la vía en la que participen en la inflamación ; en el grupo de las citoquinas pro inflamatorias está la IL1, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-), las IL6 e IL8, involucradas en la iniciación y amplificación de los procesos inflamatorios, determinantes fisiopatológicos de la sepsis y el shock séptico; en el endotelio estas citoquinas, favorecen la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y adherinas) para monocitos y neutrófilos, permitiendo su posterior migración tisular. En el grupo de las citoquinas anti-inflamatorias esta la IL10, el factor- transformador de crecimiento (TGF- y el activador natural del receptor de la interleuquina 1 (IRA), los cuales

modulan negativamente los eventos inflamatorios (Grisham *et al*., 1999; Szekanecz *et al*., 2006).

Las citoquinas son producidas tanto por células fijas como por células del sistema circulatorio (mastocitos, macrófagos y neutrófilos). Una citoquina a su vez induce su propia producción y la de otras citoquinas, a través de la activación de algunos factores de transcripción nuclear como son: el factor nuclear kappa B (NF- B), el factor activador de proteína-1 (AP-1) y algunas proteínas con actividad quinasa (PK), como proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína quinasa C (PKC), que regulan muchos genes indispensables para el mantenimiento de la inflamación. Un grupo de quimiocinas, como la IL8, eotaxin, oncogene relacionado con el crecimiento (GRO), el neutrófilo quimioatractor-1 inducido por citoquinas (CINC-1) y el regulador de la activación de expresión y secreción de células T normales (RANTES), con la habilidad de incrementar la llegada de leucocitos al sitio de inflamación vía interacción con receptores acoplados con guanosin trifosfato (GTP). Las citoquinas también pueden ser responsables por la inducción de algunos receptores como es el caso del factor activador plaquetario (PAF) y de IL2 y de moléculas de adhesión como las E- selectinas, e integrinas, la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula 1 de adhesión de las células vasculares (VCAM-1) (Karima *et al.,* 1999).

Las citoquinas, quimiocinas y sus receptores, así como también algunas proteínas citoplasmáticas como la serina/treonina k (IKK, enzima que fosforila I B y consecuentemente activa NF- B), el sistema enzimático fosfatidil-inositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt, que a su vez activa IKK) y el complejo I B/NF- B, están involucrados en la fisiopatología de muchas enfermedades inflamatorias, es por ello, que estas moléculas constituyen un excelente blanco para la búsqueda de fármacos anti-inflamatorios (Gilmore, 2006).

2.5.2 Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

El Oxido Nítrico (NO) regula numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la contractilidad del músculo liso, la reactividad plaquetaria y la actividad citotóxica de las células inmunes. Por otro lado, se ha encontrado que elevados niveles de NO genera diferentes patologías. Esto proporciona los fundamentos para el diseño de fármacos que modulen selectivamente concentraciones de NO. El NO es producido de forma endógena por una gran variedad de células. Es sintetizado en cantidades equimoleculares por una familia de óxido-reductasas conocidas como NOS, a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno.

Se conocen tres isoenzimas de la NOS, una de ellas es inducible (iNOS), también denominada de tipo II (NOS II); es una enzima no dependiente de calcio, la cual puede ser inducida en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y en células de la musculatura lisa y del endotelio vascular, como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como el interferón gamma, el TNF- y los lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (LPS) bacteriano y ser inhibida por GCs. La isoforma iNOS cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares. El NO puede funcionar como una molécula pro-inflamatoria, mediante la activación de las enzimas COX y con ello aumentar la producción de las PGs (Gilmore, 2006).

El NO puede inhibir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, lo que impide su entrada al tejido lesionado (Grisham *et al*., 1999).

2.5.3 Enfermedades inflamatorias

Una excesiva respuesta proinflamatoria (o deficiente respuesta antiinflamatoria) es importante en un gran número de patologías (Esch, 2000). Igualmente, una deficiente respuesta proinflamatoria (o excesiva respuesta antiinflamatoria) podría resultar insuficiente

para eliminar organismos patógenos invasores, lo que conduciría igualmente a efectos deletéreos.

Ciertas patologías cursan con procesos inflamatorios tales como: la artritis reumatoide, el asma, enfermedad inflamatoria intestinal, la EPOC, bronquiectasias (ej. fibrosis quística), tuberculosis, enfermedad inflamatoria pélvica, psoriasis, uretritis, cervicitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, entre otras.

2.5.4 Terapia antiinflamatoria

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

Los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides

Son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversos caminos, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen las IL-3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eotaxina y la citoquina RANTES (citoquina expresada y secretada en células T normales), entre otras. También reducen la proliferación de linfocitos T, e inducen la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2. Disminuyen también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto inducen una disminución en la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen entre otros la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios y de crecimiento. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros.

Los analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroides (AINEs)

Los AINEs son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima COX.

Los AINEs son sustancias capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los hacen útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales el dolor está relacionado con la intensidad del proceso inflamatorio. Estos fármacos se agrupan en varias clases químicas:

a) Salicilatos: Ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, acetilsalicilato de lisina, diflunisal, sulfazalacina o salicilazo sulfapiridina, salicilato de sódio, salicilamida.
b) Pirazolonas y análogos: Fenilbutazona, pirazinobutazona o feprazona, antipirina o fenasona, aminopirina, dipirona, oxifenbutazona, gamacetofenilbutazona, carudol clofenazona, bumadizona, suxibuzona, azapropazona, metamizol.
c) Paraminofenol: Paracetamol o acetaminofeno, fenacetina.
d) Derivados indolacéticos (Indoles): Indometacina, benzidamina, sulindac, acemetacina, proglumetacina, talmetacina.
e) Derivados arilacéticos o fenilacéticos: Diclofenaco, pirrolacético (ketorolac), piranoacético (etodolac), otros (clometacina).
f) Fenamatos o arilantranilicos (Fenamatos): Ácido mefenámico, flufenamico, niflúmico, flufenamato de aluminio, talniflumato, floctafenina, glafenina, meclofenamato, ácido tolfenámico, ácido meclofenámico, tolfenámico.
g) Derivados arilpropiónicos: Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, indoprofeno procetofeno, fenbufen, piroprofeno, suprofeno, flurbiprofeno, fenilpropionato de lisina, fenoprofeno, ácido tiaprofénico.
h) Oxicanes: Piroxicam, tenoxicam, sudoxicam, isoxicam, meloxicam.
i) Derivados de la naftilalcanonas: Nabumetona.
j) Derivados de ácidos heterocíclicos: Oxaprozin.
k) Derivados de la sulfonanilida: Nimesulida.
l) Derivados de las benzoxazocinas: Nefopam.
m) Inhibidores selectivos de COX-2: Celecoxib.

2.6 Modelos de evaluación antiinflamatoria

2.6.1 Evaluación in vivo

Para evaluar la actividad antiinflamatoria in vivo se dispone de modelos que varían en la intensidad de la reacción, estos pueden ser: modelos de inflamación aguda · y modelos de inflamación subcrónica o crónica.

En el estudio de agentes antiinflamatorios se pueden seleccionar otros agentes irritantes que permiten un conocimiento más selectivo de la forma de actuar de la sustancia objeto de estudio, como por ejemplo, bradicinina, histamina y xileno, que provocan una inflamación de origen neurogénico, mientras que el empleo de fenilpropiolato de etilo permite estudiar agentes antiinflamatorios con un largo período de latencia, como son los corticosteroides (Ríos *et al.,* 2004).

Dentro de los modelos de inflamación aguda se pueden emplear tres métodos, cada uno presenta características especiales dependiendo de las condiciones bajo las cuales se realice el estudio.

Edema plantar por carragenina

El método por edema plantar por carragenina fue descrito por primera vez por Winter and Porter, 1957, y posteriormente modificado por Sughisita et al., 1981. Ha sido uno de los métodos de mayor utilidad en la discriminación de fármacos antiinflamatorios por su sencillez y reproducibilidad. Consiste en la administración subcutánea de una pseudo solución de carragenina (un muco polisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondrus crispus* y *Gigartina stellata*) a nivel de la aponeurosis plantar de la rata o del ratón. El producto a ensayar se puede administrar por diferentes vías sea intraperitonal, oral, etc. La respuesta promovida por la carragenina es de tipo bifásica. La primera fase es mediada a través de la liberación de histamina, serotonina y quininas, mientras la segunda fase está asociada a la liberación de prostaglandinas, bradiquinina, proteasa y lisosoma, con un efecto máximo que se presenta alrededor de 3 h de la inyección de carragenina (Chakraborty *et al*., 2004).

Protocolo experimental por aceite de crotón

Consiste en la administración tópica del aceite de croton, una mezcla de ésteres y otros componentes, los cuales poseen propiedades irritantes. Esté método se utiliza farmacológicamente para provocar una inflamación localizada en las orejas de los animales de laboratorio, inflamación que responde a los antiinflamatorios no esteroideos. Puede aplicarse conjuntamente con el colorante azul de Evans con el objeto de determinar la capacidad de la sustancia a evaluar para inhibir la permeabilidad vascular (Hetter, 2000).

Edema auricular en ratón inducido por el 13-Acetato de1-12-O-tetradecanoil- forbol (TPA)

Esta técnica, fue descrita por De Young et al., 1989, y modificada por Payá et al., 1993. El TPA es el más potente de todos, este posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores. La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación y eritema, extravasación y edema. A nivel histológico, se produce: agregación plaquetaria, agregación y adherencia de compuestos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos), migración a la dermis y degranulación de mastocitos. También, se observa la acumulación y migración de leucocitos al compartimiento subcorneal epitelial, particularmente alrededor de los folículos que degenera en la formación de abscesos subcorneales. A partir de 24 h aparece incremento de mitosis en la membrana basal epidérmica, lo que conlleva hiperplasia y engrosamiento epidérmico aparente.

A nivel bioquímico, en minutos y hasta varias horas después, se elevan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y las PGs E1, E2 y F2. La síntesis proteica del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxiribonucleico (DNA) empieza a ser significativa a las 12h y llega al máximo entre 48h. La actividad del TPA parece implicar o ser independiente de la liberación y metabolismo del ácido araquidónico, lo que puede ocurrir simultáneamente con o casualmente subsecuente a la interacción del TPA con un receptor de la proteina quinasa C (PKC) estimulándola de modo análogo al diacilglicerol.

2.6.2 Evaluación in vitro

Las células fagocíticas, tales como los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos, responden a una variedad de estímulos de membrana por la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Está secuencia coordinada de reacciones bioquímicas conocida como estallido oxidativo, es iniciada por un incremento en la recaptación de oxígeno seguida por la reducción de un electrón del oxígeno a superóxido (O2-) usando nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o la ubiquinona oxidorreductasa (NADH) como el donador del electrón, en una reacción catalizada por la oxidasa dependiente de NADPH. Los macrófagos juegan un rol crucial modulando la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria. Un medio por el cual los macrófagos modulan la inflamación es por su capacidad para sintetizar mediadores biológicos, como prostaglandinas y NO, los cuales tienen numerosos efectos cardiovasculares e inflamatorios (Beckman *et al*., 1990).

La citotoxicidad es frecuentemente atribuida de forma directa al óxido nítrico (NO), sin embargo la toxicidad del NO es más probable que resulte de la reacción del NO con el radical superóxido (O2-) para producir el oxidante poderoso y altamente tóxico radical peroxinitrito (ONOO-) (Beckman *et al*., 1990). Bajo condiciones fisiológicas, las células producen sólo pequeñas cantidades de NO, por las isoformas constitutivas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS), y sólo cantidades de trazas de especies reactivas de oxígeno (ROS) están disponibles para recoger el NO. En contraste, grandes cantidades de NO son generadas por la isoforma inducible de NOS (iNOS) en diversos escenarios inflamatorios, frecuentemente acompañados de una gran producción de ROS, lo que podría cambiar la química del NO, hacia la formación de ONOO-, anhídrido nitroso (N2O3), que son potentes oxidantes, nitrantes y nitrosantes.

El lipopolisacárido (LPS) es un polímero presente en la pared celular de bacterias Gramnegativas que estimula a los macrófagos a que liberen citocinas y NO, siendo por tanto un potente estimulador de inflamación aguda en muchas especies animales. Es por está razón, que el modelo de estimulación in vitro de líneas celulares de macrófagos murinos por el LPS, y la determinación de la inhibición de la producción de NO por compuestos aislados, permite proporcionar una estimación del efecto antiinflamatorio de los mismos. Una importante actividad de los fagocitos es su habilidad para responder a un estímulo apropiado por la activación del "estallido oxidativo", el cual comprende el incremento de la recaptación de oxígeno, producción de anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno. Los radicales de oxígeno generados en el estallido oxidativo pueden participar en la inflamación (Baehner *et al.,* 1976). Conjuntamente con la determinación de nitritos debe ser ensayada la viabilidad por el método colorimétrico del MTT. La sal de tetrazolio, MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro), es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenadas presentes en mitocondrias activas (de células viables) produciendo cristales de formazán azul oscuro insolubles en medio acuoso (Mosmann, 1983).

2.7 Literatura citada

A.V. Rao, L.G. Rao, Carotenoids and human health, Pharmacol. Res. 55(2007) 207-216.

Baehner R, Boxer L, Davis J. 1976. The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. Blood 48: 309 – 313

Banafsheh Amir Aslani y Sirous Ghobadi. 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the inmune system. Life sciences. 146:163-173.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci 87: 1620 - 1624.

Bergström S, Ryhage R, Samuelsson B y Sjövall J. 1963. Prostaglandins and related factors.15. The structures of prostaglandin E1, F1a, and F1b. J Biol Chem 238: 3555 - 3564.

Bermúdez, A., Olivira, M.M.A. y Velásquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus enfoques actuales. Interciencia. 30:453-459.

Bhattacharjee S. K. Herbaceous perennials and shade loving foliege plants. Jaipur, India; Pointer Publishers; 2006.

Cy, N.R., M.I. Singk, L.L. Achlluredy, H.N. Nigg, S. Nagy. 1985. Isolation and partial characterization of phytotoxic compounds from lantana (*Iriana cámara L.*) Journal of Chem. Ecol: 11(8); 979-988.

Dinstel RR, Cascio J, Koukel S. The antioxidant level of Alaska´s wild berries: hihg, higher and highest. Int J Circumpolar Health 2013; 72:796-802.

Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., 2007. Inflammation in wound repair: molecular and celular mechanisms. J. Investig. Dermatol. 127, 514-525.

Esch M. 2000. Investigation of the efficacy of a poly- vinil-pyrrolidone-iodine complex for treatment of digital dermatitis in dairy cows (poster) Proceeding XI International Symposium on dissorders of the ruminant digit. Parma. Italy.

Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O2-), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem 272: 18515 - 18517.

Funk C. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. Science 294: 1871 - 1875.

Garcia-Mendoza AJ, María de Jesús Ordoñez y Miguel Briones-salas. (2004). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gilmore TD. 2006. Introduction to NF- B: players, pathways, perspectives. Oncogene 25: 6680 - 6684.

Grisham MB, Jourd'Heuill D, Wink, DA. 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 276: G315 - G321.

Grisham MB, Jourd'Heuill D, Wink, DA. 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 276: G315 - G321.

Halbinger F & Soto M. Laelias of Mexico. 1997. Herbario AMO

Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochimicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry: 68; 2831-2846.

Hetter GP. 2000. An examination of the Phenol- Croton oil Peel: Part I. Dissecting the formula. Plastic Reconstr Surg 105: 227 - 239.

I.S. Young, J.V. Woodside, Antioxidants in health and disease, J. Clin. Pathol. 54(2001) 176-186.

Jensen, W.B. 2007. The origin of the Soxhlet extractor. Ask the historian. J. Chem. Educ. 84. 1913-1914.

K. Rahman, Studies on free radicals, antioxidants,and co-factors, Clin. Interv.Aging 2(2007)219-236

K.B. Pandey,S.I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, Oxidative Med. Cell. Longev. 2(2009) 270-278.

Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. Mol Med Today 5: 123 - 132.

L.A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health, Int. J.Biomedic. Sci. 4(2008) 89-96.

Lijun W. y C. Weller. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. ELSEVIER. Nebraska- Lincoln.

Luque de Castro, M. D. y Garcia, L.E.A. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica Acta. 369. 1-10. Spain.

Luque, G.J.L. y Luque de Castro, M.D. 2004. Focused microwave-assisted oxhlet extraction: devices and aplications. Talanta. 64. Pp 571-577.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55 – 63.

Musharof, H. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances- An overview. Fitoterapia. 82: 102-140.

Nelson NA. 1974. Prostaglandin nomenclature. J Med Chem 17: 911 – 918

Nuñez, C. E. 2008. Extracciones con equipo Soxhlet.

Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. WHO/EDM/TRM/ 2002.1. Ginebra.

Rajendra D. Kshirsagar, Yogesh B. Kanekar, Suresh D. Jagtap, Shakti N. Upadhyay, Rajesh Rao, Sandip P. Bhujbal, Jagdish N. Kedia. 2010. Phenanthrenes of Eulophia ochreata Lindl. International Journal of Green Pharmacy.

Rakoff, H. & Norman, C.R. (2005). Química orgánica fundamental. Limusa. México. pp. 601-630.

Safayhi H, Sailer ER.1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Planta Medica 63: 487 - 493.

Salazar-Rojas, V. M.; Herrera-Cabrera, B. E.; Flores, Palacios, A. y Ocampo-Fletes, I. 2007. Uso tradicional y conservación de la “calaverita” *Laelia aceps subsp. Dawson* ii F. Chilapensis Soto- Arenas en la región de Chilapa, Guerrero. Costa Rica. Lankesteriana. 7(1-2):368-370.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicine: current status and future propect. Int J Pharm Sci Rev Res 2010; 3:91-100.

Szekanecz Z, Szucs G, Szanto S, Koch AE. 2006. Chemokines in rheumatic diseases. Curr Drug Targets 7: 91 - 102.

Vanhaelen, M., J. Lejoly, M. Hanocq, L. Molle. 1991. Cümatic and geographical aspects of medicinal plant constituents. In The medicinal plant industry. De. By R.O.B. Wijesekera. Florida, CRC press. Pp. 59-76.

Wagner H and Bladt S. Plan Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. 2ª.ed. 2001.

CAPITULO III

PERFIL FITOQUIMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES DE EXTRACTOS HIDROETANOLICOS DE *Laelia furfuracea* (Orquidacea)

Resumen

Se conoce muy poco sobre la naturaleza química de las sustancias en las plantas y las aplicaciones de los compuestos bioactivos naturales, pero nada se sabe de los compuestos fitoquímicos que están presentes en la orquídea *Laelia furfuracea*. Es por ello que el objetivo de este estudio fue realizar un perfil fitoquímico de los extractos de hojas, flores y pseudobulbos de *Laelia furfuracea*; de igual modo determinar la actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales de los diferentes extractos. Para lo cual se utilizó el método de Harborne y Kokate para el perfil fitoquímico; 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) para actividad antioxidante, reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles y tricloruro de aluminio para flavonoides. Se demostró la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, glicosidos cardiotónicos y quinonas; fuerte actividad antioxidante y altas concentraciones de polifenoles en los extractos de hojas y pseudobulbos. Se concluye que *L. furfuracea* podría ser usada dentro la medicina tradicional para la cura de ciertos padecimientos y dar la pauta para futuras investigaciones en diferentes campos.

Palabras clave: *polifenoles, antioxidante, uso medicinal*

3.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas producen metabolitos secundarios como respuesta a las variaciones en las condiciones climáticas de su medio ambiente o como defensa al ataque de patógenos, pueden dar origen a terpenos, esteroles, fenilpropanoides, taninos, cumarinas, chalconas, saponinas, alcaloides, carotenoides y fenoles (Hespporte *et al*., 2015; Özlem *et al*., 2011; Rodríguez *et al*., 2013; Sameena *et al*., 2013; Sánchez *et al*., 2014).

Los compuestos naturales de los sistemas vegetales pueden ser bioactivos, fitoquímicos o quimiopreventores; actúan como sistemas antioxidantes altamente protectivos siendo efectivos al neutralizar el exceso de radicales libres y protegen a la célula de efectos perjudiciales (Banafsheh *et al*., 2016) que se traduce en beneficios para la salud.

Un antioxidante se define como aquel compuesto capaz de disminuir el daño celular, protege a las biomoléculas de la oxidación y/o inhibe los procesos apoptóticos generados por especies reactivas del oxígeno (EROs) (Ferrari, 2004), mediante la liberación de electrones (Avello & Suwalsky, 2006). Los antioxidantes atrapan o neutralizan los radicales libres, que se describen como moléculas altamente reactivas que contienen uno o más electrones impares fuera de su órbita, estos son originados por el oxígeno, nitrógeno y sulfuro dando especies reactivas de oxigeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y Especies reactivas de sulfuro (RSS) (Banafsheh *et al*., 2016).

La disminución de antioxidantes y el aumento en las concentraciones de radicales libres en las células causa un desequilibrio que resulta en estrés oxidativo, un proceso deletéreo que

puede causar daño a todo tipo de biomoléculas presentes en el cuerpo incluyendo proteínas, enzimas, aminoácido, lípidos, DNA y carbohidratos (Halliwell *et al*., 1999 y Marnet, 1999). Siendo está la causa de una serie de enfermedades como cáncer, diabetes, hipertensión, aterosclerosis, respiratorias agudas e inflamatorias (Rajendran *et al*., 2014).

Algunas epecies de orquideas han presentado alta actividad antioxidante (Chinsamy *et al*. 2014) y se les ha comprobado ser efectivas para la cura de ciertos padecimientos en la medicina tradicional (Musharof, 2011;). *Laelia furfuracea* es una orquídea endémica de Oaxaca, México; conocida como “Ita ndeca” (morada) en Mixteco. Florece de octubre a diciembre, y de acuerdo a las celebraciones de la temporada se utiliza para adornar altares para las festividades de día de muertos, de la virgen de Guadalupe y pesebres navideños. Las flores en infusión junto con una rajita de ocote y miel virgen son utilizadas en la medicina tradicional para la cura de la tos según narraciones de personas locales.

El objetivo de este estudio fue realizar un perfil fitoquímico de los extractos de hojas, flores y pseudobulbos de *Laelia furfuracea*; de igual manera determinar la actividad antioxidante, flavonoides y fenoles totales de los diferentes extractos de la planta.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Colecta de material

El material vegetal consistió en plantas completas de *Laelia furfuracea* que fueron obtenidas en Santo Domingo Yanhuitlán, en la región de la Mixteca, Oaxaca, México. En diciembre de 2014. Un ejemplar de respaldo fue herborizado y depositado en el Herbario Oax del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Oaxaca (R. Solano 4244).

3.2.2 Preparación de las muestras

Flores, hojas y pseudobulbos fueron separados de la planta y sometidos a deshidratación a 40 °C hasta peso constante. Cada una de las partes se pulverizo y se sometió a un proceso de extracción solido-liquido con equipo Soxhlet, empleando 5 g de materia prima con agua-etanol (1:1), a una temperatura de 100°C y por un tiempo de dos horas de extracción. Los diferentes extractos fueron filtrados y concentrados en un rotavapor Buchi R-240, para los análisis posteriores.

3.2.3 Perfil fitoquímico

El extracto hidroetanolico de flores, hojas y pseudobulbos de *L. furfuracea* fueron usadas para el perfil fitoquímico preliminar desarrollando la metodología de Harborne (1998) y Kokate (1997).

Prueba para alcaloides

Se tomaron 5 mL de la solución de cada uno de los extractos y se agregó 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, se calentó a ebullición por 5 min, se dejó enfriar y se filtró. Se dividió en tres muestras, una para el testigo para referenciar el color y dos para las pruebas confirmatorias de reacción, usando el reactivo de Dragendorff y Wagner, siendo positiva si se presentaba un precipitado naranja o un precipitado café-naranja, en la reacción.

Prueba para flavonoides

Se tomaron 0.5 mL de cada muestra y se diluyó en etanol a un volumen de 2 mL. Se dividió en tres porciones, a una se le agregaron dos gotas de ácido clorhídrico concentrado y un trozo de magnesio metálico, siendo positivo con coloración roja para auronas o charconas; y de naranja a magenta para flavonas, flavonoles y flavononas. A otra porción se adicionaron tres gotas de hidróxido de sodio al 10%, siendo positiva con

coloración amarillo-rojo para xantonas y flavonas; coloración café-naranja para flavonoides; coloración azul para antocianinas y coloración de purpura-rojizo para chalconas, comparadas con el testigo.

Prueba para saponinas

A las muestras se les realizaron dos pruebas confirmatorias para saponinas. Para la prueba de altura y estabilidad de espuma, se colocó 1 mL de muestra, con 1 mL de agua y se agitó vigorosamente, dando positiva cuando aparece espuma a una altura entre 8 y 10 mm, siendo estable a 30 min. Para la reacción de Rosenthaler, la muestra se concentró de 0.5 mL a 0.1 mL. Se agregaron 2 gotas de reactivo de Rosenthaler y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, siendo positiva para saponinas triterpenoides cuando se forma una coloración violeta.

Prueba para taninos

A 1ml de las muestras de cada extracto, se le agregaron 2 mL de agua y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%, se calentó a ebullición por 1 minuto. Enfriando y filtrando. El filtrado se dividió en tres porciones, una para el testigo y dos para pruebas confirmatorias utilizando 2 gotas de reactivo de gelatina para la primera prueba y una gota de cloruro férrico al 1% con una gota de ferrocianuro de potasio al 1%, siendo positivas si formaba un precipitado blanco en el primer caso y coloración azul para compuestos fenólicos en el segundo caso.

Prueba para cumarinas

Se pesó 0.1 g de muestra, se le agregó 5 mL de etanol, se calentó y se diluyó a 5 mL. A la muestra se le adicionaron 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado. Dando positiva la prueba si presenta coloración de azul a violeta.

Prueba para quinonas

En una cápsula de porcelana se colocaron 2 mL de la muestra, se llevó a sequedad. Se agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva si da una coloración roja indicando la presencia de antraquinonas.

Prueba para glucósidos cardiotónicos

En una cápsula de porcelana se colocó 2 mL de muestra y se concentró a la tercera parte de su volumen original, después se dividió en tres porciones en placas de porcelana con muescas. Una para el testigo y las otras dos para las pruebas. En la primera prueba la muestra se dejó evaporar y se le adicionaron 3 gotas de piridina, una gota de nitroprusiato de sodio al 5% y posteriormente 4 gotas de hidróxido de potasio, dando positivo si aparecía una coloración roja; en la segunda prueba se agregaron 3 gotas del reactivo de Baljet, dando positivo si presentaba una coloración de naranja a rojo oscuro.

Prueba para sesquiterpenlactonas

Se colocó una porción de la muestra en una cápsula de porcelana y se agregaron 2 gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2N y una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol, se calentó la mezcla hasta ebullición por 2 minutos y se dejó enfriar, se llevó a pH 1 y finalmente se agregó 1 gota de cloruro férrico al 1%, para una prueba positiva debe presentar coloración roja, violeta o rosa.

3.2.4 Actividad antioxidante por DPPH

La determinación de actividad antioxidante del extracto crudo de flores, hojas y pseudobulbos se realizó, empleando el método de captura de radicales libres de Brand. (1995) 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (Aldrich, CAS 1898664). Empleando como

estándar ácido ascórbico (Sigma, CAS 50-81-7) para la curva de calibración. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

El indice de actividad antioxidante (AAI), según Scherer; (2009) se calculó como:

$$\mathrm{AAI} = \frac{\text{concentración final de DPPH° } (\mu g/ml)}{\mathrm{IC}_{50}(\mu g/ml)}$$

donde

IC_{50} (concentración proporcional al 50% de inhibición) se calcula con una curva con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de las muestras evaluadas y se interpola el valor 50 % de inhibición en donde se determina la concentración.

El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calcula mediante la siguiente ecuación (Turkmen *et al,* 2005; Ibarra-Estrada, 2011)

$$(\%\ \text{inhibición}) = \frac{\mathrm{Abs}_{\mathrm{control}} - \mathrm{Abs}_{\mathrm{muestra}}}{\mathrm{Abs}_{\mathrm{control}}}(100)$$

donde

$Abs_{control}$= es la absorbancia de la solución de DPPH sin muestra y;

$Abs_{muestra}$= es la absorbancia de la muestra (DPPH + muestra)

3.2.5 Determinación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales se determinó empleando el método descrito por Folin y Ciocalteau (Folin-Denis Reagent; Fluka, CAS 47742) modificado por Singleton y Rossi (1965), para cada uno de los extractos. Utilizando como estándar ácido gálico (Fluka, CAS 149-91-7) para la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg Equivalente de ácido gálico/g muestra (mg EqAG/ g). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.6 Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó empleando el método colorimétrico de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) (Sigma Aldrich, CAS 7446-70-0) de Woisky y Salatino (1998) modificado por Chang *et al.,* (2002), para cada uno de los extractos. Empleando como estándar Quercetina (Sigma, CAS 117-39-5) para la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg Equivalentes de Quercetina/g de muestra (mg EqQ/g). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

3.2.7 Detección de polifenoles por Cromatografía en capa fina

Los extractos crudos de flores, hojas y pseudobulbos fueron disueltos en metanol para ser usados en la comparación de cromatografía en capa fina de acuerdo a Wagner y Bladt (2001). Empleando placas de aluminio recubiertas de silica gel. Utilizando como solventes de elusión acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26). La detección de las placas se hizo en lámpara de luz UV a 254 nm y empleando el revelador Natural Products-Polyethylene Glycol Reagent (NP/PEG) (=NEU-reagent) para flavonoides y ácidos fenólicos. En donde la placa es esparcida con diphenylboric acid-B-ethylamino ester (=diphenylboryloxyethylamine, NP) 1% con 10 mL de metanol, seguido de polyethylene gllycol-4000 (PEG) 5% en 8 mL de etanol para incrementar la intensidad de la fluorescencia producida en UV-365 nm.

3.3 Resultados

3.3.1 Perfil fitoquímico

El perfil fitoquímico preliminar en *L. furfuracea*, los resultados obtenidos demuestran la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, glicosidos cardiotónicos y quinonas en los extractos de pseudobulbos, además de sesquiterpenlactonas en el extracto de las flores; y flavonoides de origen xantonas y flavonas, taninos, glicosido cardiotónicos y quinonas en el extracto de hojas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Pérfil fitoquímico de extractos de flores, hojas y pseudobulbos de *Laelia furfuracea*.

Extracto de la planta	Prueba								
	Flavonoides		Saponinas	Taninos	Cumarinas	Glucosidos Cardiotonicos	Sesquiterpenlactonas	Quinonas	Alcaloides
	Flavonas, flavonoles y flavononas	Xantonas y flavonas	Triterpenoides	compuestos fenólicos				Antraquinonas	
	naranja -magenta	amarillo -rojo	violeta	azul	azul-violeta	rojo	rojo	rojo	café-naranja
Flores	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Hojas	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Pseudobulbos	+	+	+	+	-	+	-	+	-

presencia (+); ausencia (-)

Las flores, es la parte de la planta con el mayor rendimiento de extracción con un 33%, porcentaje mayor a hojas y pseudobulbos que tienen un 14 y 18.3% por cada gramo de materia seca (Cuadro 2).

3.3.2 Determinación de actividad antioxidante

El extracto de hojas y pseudobulbos presentan el mayor porcentaje de inhibición de actividad antioxidante en un 84.660% de actividad, con un Índice de actividad antioxidante (IAA) de 1.328 y 1.335 mg EqAA/g, respectivamente. Mientras que, el extracto de flores presentó un 42.601% de inhibición con un IAA de 0.673 mg EqAA/g (Cuadro 2).

3.3.3 Determinación de fenoles totales

Concentraciones de 394.76, 265.4 y 129.52 mg EqAG/g de fenoles totales se determinaron en el extracto de hojas, pseudobulbos y flores. Siendo las hojas la que presenta la mayor concentración de fenoles, comparada con los extractos de las otras dos partes de la planta (Cuadro 2).

3.3.4 Determinación de flavonoides totales

En cuanto a flavonoides totales determinados en los diferentes extractos de la planta, se demostró que de igual manera las hojas es la parte de la planta con la mayor concentración de 129.96 mg EqQ/g, mientras que en pseudobulbos y flores se determinaron concentraciones de 74.56 y 25.16 mg EqQ/g, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Determinación de actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales de extractos de *Laelia furfuracea*.

Parte de la planta	Rendimiento de extracción		% de inhibición	IAA	Flavonoides totales (mg EqQ/g)	Fenoles totales (mg EqAG/g)
	(mg/g muestra)	%				
Flores	320.1	33.0	42.601±0.055	0.673±0.007	25.16±0.006	129.52±0.105
Hojas	140.0	14.0	**84.660±1.404**	**1.328±0.025**	**129.96±0.005**	**394.76±0.192**
Pseudobulbos	180.03	18.3	**84.660±0.096**	**1.335±0.012**	74.56±0.008	265.4±0.065

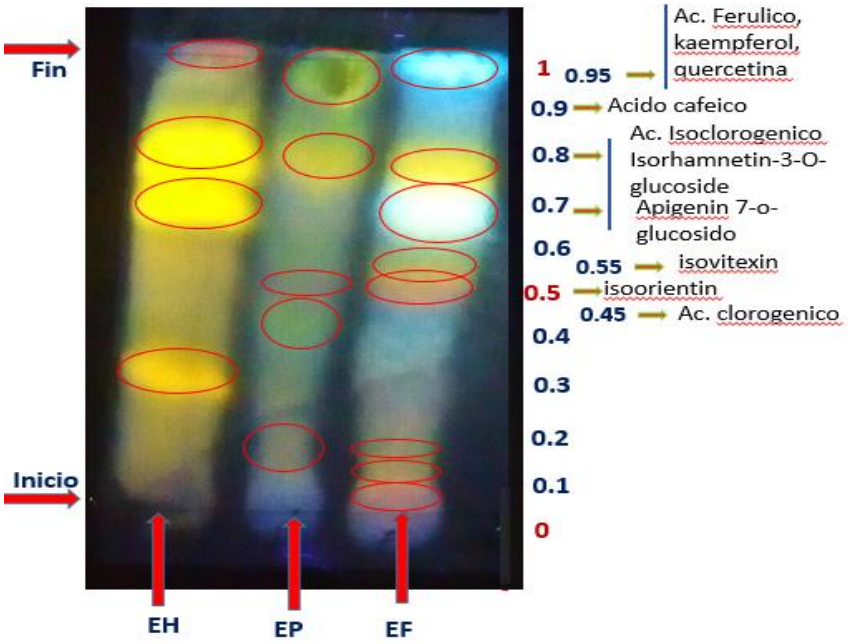
mg EqAA= Miligramos equivalentes de ácido ascórbico
mg EqQ= miligramos equivalentes de Quercetina
mg EqAG= miligramos equivalentes de ácido gálico

3.3.5 Detección de polifenoles por cromatografía en capa fina

Las cromatografías de capa fina del extracto de flores, hojas y pseudobulbos demuestran la presencia de polifenoles que emiten fluorescencia a 254 nm en UV y dependiendo del tipo de estructura presentan fluorescencias de naranja a rojo, amarillo oscuro y verde o azul con el revelador NP/PEG empleado para flavonoides y ácidos fenólicos.

En la placa de extracto de hojas se revelaron bandas de coloración amarilla a diferentes índices de retención (rf) de 0.3 y 0.7-0.8; la placa del extracto de pseudobulbo mostró bandas de coloración verde y verde-amarillo en rf de 0.2, 0.4-0.6 0.8 y 09; y finalmente la placa del extracto de flores presentó bandas azules, amarillas y rojo-naranjas en rf de 0.5-0.2 y 0.5-0.9 (figura 1). Probablemente en las bandas de coloración que muestran los extractos estén presentes el ac. ferulico, kaempferol, Quercetina, ac. cafeico, ac. isoclorogenico, Isorhamnetin-3-O glucoside, apigenina 7-O-glucosido, isovitexin, isoorientin o ac. Clorogénico.

Figura 1. Cromatografia en capa fina revelado con NP/PEG para Flavonoides glicosidos presentes en extractos de *Laelia furfuracea.*



Extracto de hojas (EH), extracto de pseudobulbo (EP) y extracto de flores (EF)

3.4 Discusión

Los sistemas vegetales están constituidos por metabolitos secundarios que son funcionales en la salud, siendo los responsables de diferentes actividades biológicas como antioxidante, antimicrobiano, antifungico y anticancerígeno (Kokate, 1997), normalmente estos compuestos bioactivos son aislados de extractos polares de las plantas (Hossain et al., 2011).

Los grupos de compuestos bioactivos pueden ser detectados con el perfil fitoquímico preliminar mediante reacciones colorimétricas. En este estudio se realizaron pruebas para la detección de los metabolitos secundarios: flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, glucosidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, quinonas y alcaloides. Los resultados indican la presencia en flores y pseudobulbos de flavonoides del tipo flavonas, flavonoles, flavononas, xantonas o flavonas; saponinas de tipo triterpenoides; taninos; glucosidos cardiotónicos y quinonas; además las flores fueron las únicas que presentaron sesquiterpenlactonas. Las hojas presentaron flavonoides de tipo xantonas y flavonas,

taninos, glucosidos cardiotónicos y quinonas. En flores, hojas y pseudobulbos no se detectaron cumarinas ni alcaloides. Los compuestos fitoquímicos presentes poseen propiedades biológicas como potentes antioxidantes (Kanti *et al*., 2009; Kosalec *et al*., 2012), antiapoptosis, anticarcinógeno, antiinflamatorio, antiarterosclerosis (Sandhyarani, 2011) y protectivos cardiovasculares (Lalit *et al*., 2011), quizá la presencia de estos compuestos en *L. furfuracea* podría avalar el uso en la cura de la tos en la medicina tradicional.

Hojas y pseudobulbos de *L. furfuracea* presentaron un IAA>1 lo que representa una fuerte actividad antioxidante, mientras que las flores presentaron un IAA<1 moderada actividad de acuerdo a la clasificación de Scherer y Godoy (2009), en donde un IAA>2 presenta muy fuerte actividad antioxidante. Los polifenoles como los acidos fenólicos, flavonoides, estilbenos o lignanos actuan como fuertes antioxidantes (Banafsheh et al., 2016).

En las hojas las concentraciones de flavonoides y fenoles totales fueron de 129.96 mg EqQ/g y 394.76 mg EqAG/g, respectivamente, estas concentraciones fueron mayores a las determinadas en pseudobulpos que presentó 74.56 mg EQ/g y 265.4 mg EqAg/g, y a las flores que presentaron una menor concentración de flavonoides y fenoles. En *L. furfuracea* las concentraciones de flavonoides y fenoles determinadas fueron mayores a las reportadas en otras especies de plantas como *Erica arborea* que determinaron una cantidad de fenoles y flavonoides totales de 78.49 mg EAG/g y 54.08 mg EQ/g, respectivamente (Amezouar *et al*., 2013); y las concentraciones de fenoles en *Mentha piperita* L., *Cymbopogon citratos, Matricaria chamomilla* L., *Heterotheca inuloides* y *Peumus boldus* oscilaron entre 61.84 a 1628.05 µg eq. AG/mL; las concentraciones de flavonoides de las mismas especies estuvieron en los rangos de 44.36 a 426.30 µg eq. (+)-catequina/mL (Muños *et al.,* 2012).

Las cromatografías en capa fina confirmaron la presencia de compuestos fenólicos en los extractos hidroetanolicos de flores, hojas y pseudobulbos de *L. furfuracea*, previamente detectados en el perfil fitoquimico. Las bandas de coloración en relacion a los índices de

retención (Rf) detectados en los extractos indican la presencia de flavonoides y acidos fenólicos con Rf de 0.25 a 0.75. Coloraciones de naranja-amarillo detectados podría contener flavonoles como Quercetina (Wadsworth *et al.,* 2001*,* da silva*,* 2013), miricetina y kaemferol (Alcalde *et al.,* 2013); las intensidades naranja muestran flavonas como luteolina (Fonseca *et al*., 2010) y apigenina; y las intensidades azul ácidos carboxílicos fenólicos *(Wagner, H y Bladt, S, 2001)*, que también han sido detectados en otros sistemas vegetales. Sin embargo, para conocer y confirmar la presencia de cada grupo de compuestos fenólicos se requieren otras herramientas, como cromatografía de líquidos o RMN.

3.5 Literatura citada

Alcalde B.S.M, Flores M.L, Cordoba O.L, Taira C.A & Gonzalezany S. 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of Chiliotrichum diffusum. Revista Brasileira de Farmacognosy 23(4):699-705

Amezouar F, Badri W, Hsaine M, Bourhim N & Fougrach H. 2013. Évaluation des activités antioxidante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. Pathologie Biologie 61:254-258.

Avello, M y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea,* 494: 161-172.

Banafsheh Amir Aslani y Sirous Ghobadi. 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the inmune system. Life sciences. 146:163-173.

Brand-Williams,W; Cuvelier, M.E; Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol,* 28: 25-30.

Carretero, M.E. 2000. Compuestos fenólicos: Taninos. Panorama Actual Médica. 24(235): 633-636.

Chang, C.C; Yang, M.H; Wen, H.M; Chern, J.C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis,* 10(3): 178-182.

da Silva, A.O., Damaceno, A.A., Almeida, D.A., Balogun, S.O., de Oliveira, R.G., Aires, A.A., Soares, I.M., Marson, A.P.,Ascéncio, S.D. y de Oliveira, M.D.T. 2014. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of Macrosiphonia longiflora (Desf.) Müll.Arg. Journal of etnhopharmacology. 154: 319-329.

Fonseca FA, França CN, Póvoa RM, Izar MC. 2010. Estatinas y accidente cerebrovascular: posibles mecanismos de acción de la protección neurovascular. Rev Neurol 51: 551 - 560.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 1999.

Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London: Chapman and Hall; 1998, p. 54-84

Ibarra-Estrada, E; Pacheco-Sánchez, M; García-Mateos, R; San Miguel-Chávez, R; Ramírez-Valverde, G; Soto-Hernández, R.M. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana Miller.* Revista Fitotecnia Mexicana*,* 34 (4): 241-246.

Kanti Bhooshan Pandey, Syed Ibrahim Rizvi. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2009; 2(5): 270-78

Kokate KC. Practical pharmacognosy. 4th ed. Delhi: Vallabh Prakashan; 1997, p. 218.

Kosalec I, Kremer D, Locatelli M, Epifano F, Genovese S, Carlucci G, Randic M and Zovko K.M. 2012. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of Rhamnus alaternus, R. fallax, R. intermedia and R. pumila. Food chem. 136 (2) 335-41.

Lalit O, Toshiyuki A, Kuo-Hsiung L, Shi J.L. 2011. The aqueous extract, not organic extracts, of Terminalia arjuna bark exerts cardiotonic effect on adult ventricular myocytes. Phytomedicine. 18:259-265.

Marnett LJ. Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res 1999; 424: 83-95.

Muñoz V.E.E, Rivas D.K, Loarca P.M.G.F, Mendoza D.S, Reynoso C.R y Ramos G.M. 2012. Comparacion del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infuciones herbales comerciales. Revista Mexicana de Ciencias Agricolas 3:481-495.

Rajendra DK, Yogesh B.K, Suresh D.J, Shakti N.U, Rajesh R, Sandip P.B and Jagdish N.K. 2010. Phenantrhenes of *Eulophia ochreata* Lindl. International Journal of Green Pharmacy.

Sandhyarani D, Khomdram, Portssangham K. Singh. Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight Lamiaceae herbs of Manipur. Not Sci Biol. 2011; 3 (2): 108-13.

Scherer, R & Godoy, H.T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*,112: 654–658.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng N.R, Nogueira J.M.F, Saraiva J.A and Nunes M.L. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (Origanum vulgare) extracts and essential oil. Published online in Wiley Online Library. DOI 10.1002/jsfa.6089

Turkmen, N; Sari, F; Velioglu, S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry,* 93: 713–718.

Varalakshmi D., Muddasarul H., Garima S., Sankar P., Preedia B. y Rukkumani R. 2014. Phytochemical screening and analysis of antioxidant properties of aqueous extract of wheatgrass. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. (7): 5398-5404.

Wadsworth TL, McDonald TL, Koop DR. 2001. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lypopolysaccharide-induced signalling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. Biochem Pharmacol 62: 963 - 974.

Wagner H and Bladt S. Plan Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. 2ª.ed. 2001.

Woisky, R & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Res Journal of Apicultural*, 37(2): 99-105.

Woisky, R & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Res Journal of Apicultural*, 37(2): 99-105.

CAPITULO IV

EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO HIDROETANOLICO DE HOJAS DE *Laelia furfuracea* (Orchidacea)

Resumen

Las orquideas al igual que otras plantas en México son empleadas en la medicina tradicional para curar diferentes tipos de enfermedades. Los géneros *Prosthechea, Encyclia, Catasetum y Laelia* son empleadas para curar heridas, dolores de parto y como antiinflamatorios. El objetivo de este trabajo fue extraer, cuantificar y evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos fenólicos obtenidos del extracto hidroetanolico y de las fracciones hexanica, clorofórmica, acetato de etilo, butanolica y acuosa de hojas de *Laelia furfuracea*. El material vegetal se sometió a un proceso de extracción convencional solido-líquido por el metodo Soxhlet, empleando agua-etanol (1:1) como solventes. La actividad antioxidante fue evaluada por el método de captura de radicales libres (DPPH), la concentración de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la de flavonoides por el método colorimétrico de tricloruro de aluminio. La actividad antiinflamatoria del extracto de hojas fue evaluada con el modelo de carragenina en ratas hembras Wistar empleando dosis de 562.23 y 1000 mg/kg administradas vía oral, así como dosis de 300, 562.23 y 1000 µg/pata del extracto de hojas y de las fracciones administradas vía local. El extracto de

hojas presentó concentraciones de fenoles totales y flavonoides de 394.76±0.192 mg EqAG/g y 129.96±0.005 mg EqQ/g, respectivamente. Con un porcentaje de inhibición antioxidante de 84.660±1.404 y un IAA de 1.328±0.025 µg EqAA/g. En la evaluación de actividad antiinflamatoria la administración vía oral no presentó diferencias significativas, pero en la administración vía local las dosis de 562.23 y 1000 µg/pata, si presentaron un efecto antiinflamatorio de 36.19±5.436 y 43.36±3.187% respectivamente. Los compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS fueron 4-hydroxybenzyl alcohol (BHA), ácido málico, ácido cafeico y ácido siringico acetato. El extracto hidroetanólico de *Laelia furfuracea* tiene potencial antiinflamatorio, lo cual confirma su uso en la medicina tradicional, dicho efecto podria ser causado por los compuestos fenólicos.

Palabras clave: *orquideas, antiinflamación, antioxidante, fenoles totales, flavonoides*

4.1 Introducción

La herbolaria ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana desde épocas precolombinas, hasta el momento se tiene un registro de 5,000 especies vegetales con aplicaciones curativas.

Las orquideas al igual que otras plantas son empleadas en la medicina tradicional de diferentes culturas del mundo. Han sido usadas por milenios para la cura de diferentes tipos de enfermedades relacionadas con un efecto antiinflamatorio como dolor muscular, artritis reumatoide, asma, heridas, como broncodilatador y supresor de tumores (Musharof, 2011; Chinsamy *et al*. 2014). Estas plantas han sido usadas por diferentes grupos étnicos de México para el tratamiento de quemaduras, fiebre, diabetes, fatiga, como afrodisiaco y para problemas respiratorios e intestinales (Cruz *et al*., 2015; Cox, 2013; Deanne, 2005; García-Peña y Peña, 1981; Hágsater *et al*., 2005; Neira, 2009).

Las orquideas de los generos *Arpophyllum, Bletia, Catasetum, Cyrtopodium, Epidendrum, Laelia, Malaxis, Mymecophila, Oncidium, Prosthechea, Rhynchostele, Scaphyglotis,*

Stanhopea y Vanilla han sido mayormente utilizados en la medicina tradicional Mexicana. Las especies mexicanas de *Laelia* han sido empleadas para el tratamiento de la tos, inflamación, problemas cardiovasculares y el dolor postparto (Vergara *et al.,* 2008 & 2010). Las flores de *Laelia furfuracea* se emplea para el tratamiento de la tos en la Mixteca de Oaxaca, según narraciones locales. Pero no se ha validado este conocimiento de la medicina tradicinal, tampoco, se han identificado los compuestos bioactivos.

La inflamación es un proceso fisiológico que protege a los organismos de daños causados por agentes biológicos, físicos o químicos (quemaduras, infecciones, químicos tóxicos, alergias y otros estímulos), está caracterizado por un incremento en el flujo sanguíneo, la migración de leucocitos de la sangre al tejido dañado y la iniciación de eventos bioquímicos que propagan la respuesta inflamatoria (Alamgeer *et al*., 2015; to Dao et al., 2015).

En la inflamación una excesiva respuesta proinflamatoria (o deficiente respuesta antiinflamatoria) es importante en un gran número de patologías (Esch, 2000). Igualmente, una deficiente respuesta proinflamatoria (o excesiva respuesta antiinflamatoria) podría resultar insuficiente para eliminar organismos patógenos invasores, lo que conduciría igualmente a efectos deletéreos (Fridovich, 1997).

El proceso inflamatorio está implicado en varias patologías comunes en la población como: la artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasias (ej. fibrosis quística), tuberculosis, enfermedad inflamatoria pélvica, psoriasis, uretritis, cervicitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, entre otras (Nathan, 1987).

El efecto antiinflamatorio puede estar relacionado con la actividad antioxidante (Carlsen *et al*., 2010; Halliwell *et al*., 2005; Wiart., 2007; Gerritsen *et al*., 1995) y la presencia de compuestos naturales como terpenos, esteroles, fenilpropanoides, taninos, cumarinas,

chalconas, saponinas, alcaloides, carotenoides y polifenoles (Sánchez *et al*., 2014; Newman *et al*., 2003; Setty y Sigal., 2005; Huo *et al*., 2015; Hespporte *et al*., 2015; Rodríguez *et al*., 2013; Özlem *et al*., 2011; Alberto *et al*., 2007; Sameena *et al*., 2013). Los polifenoles más importantes en la inhibición de la inflamación aguda son los flavonoides de tipo flavones (luteolin, apigenina y glicosidos), flavonoles (quercetin, kaempferol, naringin, rutin, myricetin, morin, apigenina, luteolin, hidroxitirosol, tirosol), flavanones, flavanoles, isoflavones y antocianinas (Wagner y Bladt, 2001); ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ellagico o galico), estilbenos y lignanos que han sido identificados en extractos naturales por técnicas de HPLC acoplado a diferentes tipos de detectores (Alcalde *et al*., 2013; Calderón *et al.*, 2011; Casaburi *et al*., 2013; Da Silva *et al*., 2013; Dewapriya *et al*., 2013; Enciso, 2011; Jimarez y Montiel, 2009; kim *et al*., 2010; Pérez *et al*., 2011; Shukla y Gupta, 2010; Toffoli *et al.,* 2014; Tomovic *et al*., 2015; Wang *et al*., 2013).

En las orquideas se han documentado la prescencia de compuestos activos que actuan como potentes antiinflamatorios, *L. furfruracea* se emplea para el tratamiento de la tos en la Mixteca de Oaxaca, los procesos inflamatorios son la principal causa de muchas enfermedades degenerativas. En la busqueda de nuevas fuentes de compuestos activos se propone como objetivo extraer y cuantificar fenoles totales, flavonoides y la actividad antioxidante del extracto hidroetanolico y particiones de las hojas de *Laelia furfuracea*, y evaluar la actividad antiinflamatorio en modelo murino.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 *Colecta del material*

El material vegetal consistió en plantas completas de *Laelia furfuracea* que fueron obtenidas en Santo Domingo Yanhuitlán, en la región de la Mixteca, Oaxaca, México. En diciembre

de 2014 y abril de 2015. Un ejemplar de respaldo fue herborizado y depositado en el Herbario Oax del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Oaxaca (R. Solano 4244).

4.2.2 Proceso de extracción

Las hojas fueron separadas de las plantas y deshidratadas a 40°C hasta obtener un peso constante. Se pulverizó y se sometió a extracción convencional solido-líquido en un equipo Soxhlet, empleando 5 g de material foliar con agua-etanol (1:1), temperatura de 100°C y un tiempo de dos horas. El extracto hidroetanólico (EHHLF) se fraccionó por incremento de polaridades (Satyajit *et al*., 2006), iniciando con un disolvente de baja polaridad y volúmenes iguales solvente (hexano) y EHHLF agitando de manera enérgica y liberando la presión constantemente. Luego se dejó reposar hasta la separación de los disolventes, obteniendo una fracción soluble hexanica (FH) y una parte acuosa. La parte acuosa se mezcló con cloroformo, obteniéndose una fracción soluble clorofórmica (FC) y una parte acuosa. Esta parte acuosa se mezcló con acetato de etilo y se obtuvo una fracción soluble de acetato de etilo (FEA) y una parte acuosa. Finalmente, esta parte acuosa se mezcló con butanol, obteniéndose una fracción soluble butanolica (FB) y una fracción soluble acuosa (FA) (Mohammed *et al*., 2013). El extracto y las fracciones se filtraron y concentraron en un rotavapor Buchi R-240.

4.2.3 Perfil fitoquímico

El extracto EHHLF y las fracciones FH, FC, FEA, FB y FA fueron usados para realizar un perfil fitoquímico de acuerdo a Harborne (1998) y Kokate (1997) para la detección de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, alcaloides y quinonas.

4.2.4 Actividad antioxidante, flavonoides y fenoles totales

La determinación de actividad antioxidante del extracto y fracciones de *Laelia furfuracea*, se realizó empleando el método de captura de radicales libres de Brand (1995) 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (Aldrich, CAS 1898664), empleando como estándar ácido ascórbico (Sigma, CAS 50-81-7) para la curva de calibración. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

El indice de actividad antioxidante (AAI), según Scherer; (2009) se calculó como:

$$\mathrm{AAI} = \frac{\text{concentración final de DPPH° } (\mu g/ml)}{\mathrm{IC}_{50}(\mu g/ml)}$$

donde

IC_{50} (concentración proporcional al 50% de inhibición) se calcula con una curva con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de las muestras evaluadas y se interpola el valor 50 % de inhibición en donde se determina la concentración.

El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calcula mediante la siguiente ecuación (Turkmen *et al,* 2005; Ibarra-Estrada, 2011)

$$(\%\ \text{inhibición}) = \frac{\mathrm{Abs}_{\text{control}} - \mathrm{Abs}_{\text{muestra}}}{\mathrm{Abs}_{\text{control}}}(100)$$

donde

$Abs_{control}$= es la absorbancia de la solución de DPPH sin muestra y;

$Abs_{muestra}$= es la absorbancia de la muestra (DPPH + muestra)

La determinación de flavonoides totales se realizó empleando el método colorimétrico de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) (Sigma Aldrich, CAS 7446-70-0) de Woisky y Salatino (1998) modificado por Chang et al., (2002), empleando como estándar quercetina (Sigma, CAS 117-39-5) para la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalentes

de quercetina/g de muestra (mg EqQ/g). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

La concentración de fenoles totales se determinó empleando el método descrito por Folin y Ciocalteau (Folin-Denis Reagent; Fluka, CAS 47742) modificado por Singleton y Rossi (1965), utilizando como estándar ácido gálico (Fluka, CAS 149-91-7) para la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico/g muestra (mg EqAG/ g). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2.5 Evaluación de actividad antiinflamatoria

Se emplearon ratas Wistar hembras de 180 ±20 g de 4-7 semanas de edad provenientes del bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINCESTAV, Cd. de México). Las ratas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas a 23°C y ciclos de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad (Alcalde *et al*., 2013). El manejo de las ratas se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y a las regulaciones internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los animales fueron divididos en grupos de manera aleatoria de 5-11 individuos cada uno (González *et al*., 2011; Silverio *et al*., 2009; Aranachalam *et al*., 2002). La administración del extracto se realizó por vía oral y local.

En la administración vía oral se emplearon cuatro grupos de ratas: un control positivo al que se le administró 300 mg/kg de naproxeno (Sigma Aldrich, CAS 26159-34-2) como fármaco, un control negativo al que solo se le administró agua destilada y dos grupos que recibieron el extracto EHHLF, uno en dosis de 562.23 mg/kg y el otro 1000 mg/kg; en todos los casos las dosis se disolvieron en 1 mL de vehículo y el volumen administrado fue de 170 µL/kg mediante una canula gástrica una hora antes de inducir la inflamación.

En la evaluacion por via local se emplearon doce grupos de animales: un grupo control positivo al que se le administró 1000 µg/pata de naproxeno, un control negativo al que solo se le administro agua destilada, tres grupos que recibieron el extracto EHHLF en dosis de 300, 562.23 y 1000 µg/pata; y cinco grupos donde cada uno de ellos recibió una dosis de 1000 µg/pata de las fracciones FH, FC, FAE, FB y FA; un grupo control negativo con el vehiculo. En esta evaluación las fracciones fueron diluidas en solución salina con 10% de tween 80 como vehiculo. Los volúmenes administrados fueron de 50 µL/pata de cada animal en todos los casos, una hora antes de inducir la inflamación.

Antes de la administración oral los animales se mantuvieron en ayuno por 8 horas y con libre acceso de agua. Para la administración local los animales no requirieron de un tratamiento previo. Dos horas después de aplicado el tratamiento los animales recibieron agua y tres horas despues alimento.

En la evaluación se empleó el modelo de edema subplantar con carragenina, para el cual el proceso inflamatorio se indujo aplicando una inyección subplantar de 100 µL de carragenina 1% (Sigma Aldrich, CAS 9000-07-1) en solución salina a la pata trasera derecha de cada rata (Winter and Porter, 1957).

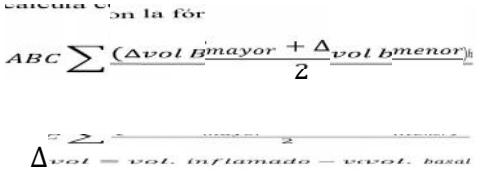
El volumen de la pata de cada rata donde fue inducido el proceso inflamatorio fue medido con un pletismometro digital (LE 7500 Mca. Panlab Harvard/Apparatus) en el tiempo basal o 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min después de administrar la carragenina (Alcalde *et al*., 2013; Rocha *et al*., 2010; Silverio *et al*., 2009; González *et al*., 2007; Arunachalamet *et al*., 2002).

Las diferencias en el volumen basal en los diferentes tiempos permitieron calcular el porcentaje de inhibición de la inflamación; mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = \left(\frac{ABC_{control} - ABC_{tratada}}{ABC_{control}}\right) 100$$

donde

Área bajo la curva (ABC) se calcula con la fórmula



4.2.6 Actividad antioxidante in vivo (NO y GSH)

Oxido nítrico (NO) en la pata

La concentración de óxido nítrico (NO) se determinó en los grupos control negativo, basal y los grupos que generaron actividad antiinflamatoria positiva al administrar el extracto en dosis de 562.23 y 1000 µg/pata via local, usando la prueba colorimétrica Cayman para Nitratos/Nitritos, acordea Tarpey et al., (2004) NO fue determinado en el homogenizado de patas de las ratas. Para el pretratamiento de las muestras de las patas se tomarón 80µL de sobrenadante de cada una, se les agregó 10 µL de Cofactor Nitrato Reductasa, seguido de 10 µL de enzima de Nitrato reductasa y se dejó incubar por 3 horas a temperatura ambiente. La determinación de NO se realizó mediante la técnica de Griess, en la que se utilizó una solución madre de nitritos a 10 mM para preparar una solución estándar a 200 µM para la curva de calibración. Tanto a las muestras de los tejidos como a las de la curva se les agregó el reactivo de Griess (primero 50 µL de sulfanilamida y posteriormente 50 µL de Naftiletilenamida), se incubó por 10 minutos para la generación completa de azoles. Donde el producto final de NO in vivo son nitritos (NO^-_2) y nitratos (NO^-_3). Inicialmente, nitrato (NO^-_3) fue convertido a nitrito (NO^-_2) por la enzima nitrato reductasa, seguido por la cuantificación de $NaNO^-_2$ usando el reactivo de Griess a 550 nm de absorbancia. La concentración de $NaNO^-_2$ en la pata fue expresada como µmol/g de tejido.

Glutatión reducido (GSH) en la pata

El glutatión reducido (GSH) fue cuantificado de igual manera en los grupos control negativo, basal y en los grupos que inhibieron la inflamación con el extracto EHHLF en dosis de 562.23 y 1000 µg/pata via local; usando el método de reactivo de Ellman (5,5´-Dithio-bis-(2-acido nitrobenzoico) conocido como DTNB (Ellman, 1959) (Cayman, 69-78-3). Desarrollado para la detección de compuestos thiol. El principio de este procedimiento está basado en la formación de 2-nitro-5-acido tiobenzoico (TNB) y glutatión disulfide (GSSG). El 2-nitro-5-acido tiobenzoico es un producto coloreado en amarillo. Medido a 412 nm. La concentración de GSH en la pata fue expresada como nM/g de tejido.

4.2.7 Pruebas estadísticas

Los resultados de las pruebas fueron expresados como la media ± el error estándar de los grupos de 6-11 animales. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos con el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Sofware Inc., USA), así como una prueba de comparación múltiple de medias de Newman-Keuls para determinar las diferencias entre ellas. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando la probabilidad fue menor a 0.05

4.2.8 Análisis de compuestos en HPLC-MS

Para el análisis de HPLC-MS las fracciones se enviaron al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologias del Instituto Politecnico Nacional. El método usado fue tune_low_Neg.m, en micrOTOF-Q II y ESI^- (Ionizacion por electroespray negativo) durante el análisis según Zhao *et al* (2014) modificado. Empleando 1 µL de muestra que se pasaron en un cartucho de C18; metanol y acetonitrilo+ácido fórmico 1% que fuerón los solventes empleados en gradientes de 5-50, 50-70 y 70-100%, tiempos de elusión de 0-10 min, escaneo inicial-final de 50-3000 m/z; Ion polar negativo y nebulizador 0.4 Bar. (Shao *et al*., 2014).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 perfil fitoquímico

En el extracto EHHLF y las fracciones FH, FC, FAE, FB y FA obtenidos de las hojas de *L. furfuracea* presentaron metabolitos secundarios. Taninos encontraron presentes en el extracto EHHLF y en las cinco fracciones; flavonoides estuvieron presentes en el extracto EHHLF y en las fracciones, excepto en la fracción FC; saponinas fueron detectables en el extracto EHHLF y las fracciones FH, FC y FAE; cardiotónicos se detectaron en el extracto EHHLF y las fracciones FAE, FB y FA; quinonas estuvieron presentes en el extracto EHHLF y las fracciones FC y FB; y sesquiterpenlactonas fueron detectables solo en la fracción butanolica (FB) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Perfil fitoquímico del extracto EHHLF y fracciones (FH, FC, FAE, FB y FA) de hojas de *L. furfuracea.*

Extracto	**Prueba**							
	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Cardiotónicos	Cumarinas	Sesquiterpenlactonas	Quinonas	Alcaloides
EHHLF	+	+	+	+	-	-	+	-
FH	+	+	+	-	-	-	-	-
FC	-	+	+	-	-	-	+	-
FAE	+	+	+	+	-	-	-	-
FB	+	-	+	+	-	+	+	-
FA	+	-	+	+	-	-	-	-

Presencia (+); ausencia (-); EHHLF (Extracto hidroetanolico de hojas de *L. furfuracea*); FH (Fracción hexanica); FC (Fracción clorofórmica); FAE (Fracción de acetato de etilo); FB (Fracción butanolica) y FA (fracción acuosa)

4.3.2 Actividad antioxidante, flavonoides y fenoles totales

El extracto EHHLF presentó un porcentaje de inhibición antioxidante de 84.660±1.404 y un valor de IAA de 1.328±0.025 mgEqAA/g. Entre las fracciones, la FAE presentó los mayores valores para la inhibición antioxidante y de IAA; valores de 91.635±0.163 % y 2.054±0.001 mgEqAA/g, respectivamente. Mientras que la fracción FA presentó los valores más bajos

de inhibición antioxidante y IAA 23.437±1.1 y 0.347±0.01 mgEqAA/g, respectivamente (Cuadro 4).

El extracto EHHLF presentó una concentración de flavonoides totales de 129.96±0.005 mg EqQ/g. Entre las fracciones, la que tuvo una mayor concentración de flavonoides fue la FAE, 503.58±0.189 mgEqQ/g, la cual resultó mucho mayor que la registrada por el extracto; en tanto, la fracción FA tuvo la menor concentración de estos compuestos 40.73±0.035 mg EqQ/g, respectivamente (Cuadro 4).

En cuanto a la concentración de fenoles totales, el extracto EHHLF presentó un valor de 394.76±0.192 mg EqAG/g. De las fracciones, la FAE fue nuevamente la que registró la concentración mas alta y mayor que la del extracto, 612.48±0.252 mg EqAG/g, mientras tanto, la fracción FA fue la que presentó la menor concentración, 129.52±0.105 mg EqAG/g, (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores de actividad antioxidante, flavonoides y fenoles totales para el extracto (EHHLF) y fracciones (FH, FC, FAE, FB y FA) de hojas de *L. furfuracea*

Parte de la planta	Actividad antioxidante por DPPH		Flavonoides totales (mg EqQ/g)	Fenoles totales (mg EqAG/G)
	% de inhibición	IAA (mg EqAA/g)		
EHHLF	84.660±1.404	1.328±0.025	129.96±0.005	394.76±0.192
FH	50.089±1.415	0.850±0.01	81.96±0.019	201.04±0.232
FC	82.922±1.746	1.408±0.006	198.16±0.093	282.8±0.140
FAE	**91.635±0.163**	**2.054±0.001**	**503.58±0.189**	**612.48±0.252**
FB	52.054±0.433	0.863±0.027	118.19±0.039	275.28±0.062
FA	23.437±1.1	0.347±0.01	40.73±0.035	207.88±0.168

mg EqAA= miligramos equivalentes de ácido ascórbico
mg EqQ= miligramos equivalentes de Quercetina
mg EqAG= miligramos equivalentes de ácido gálico
EHHLF (Extracto hidroetanolico de hojas de *L. furfuracea*); FH (Fracción hexanica); FC (Fracción clorofórmica); FAE (Fracción de acetato de etilo); FB (Fracción butanolica) y FA (fracción acuosa)

4.3.3 Actividad antiinflamatoria

Las ratas a las cuales les fue administrado por via oral el extracto EHHLF, tanto en dosis de 562.23 mg/kg como de 1000 mg/kg, después de seis horas de evaluación, presentaron

una actividad antiinflamatoria significativamente menor de 11.84 y 3.6%, respectivamente; comparado con un 64.37% que presentó el grupo de ratas que recibió naproxeno. Por otro lado, la actividad antiinflamatoria en ratas que recibieron ambas dosis del extracto no fue significativamente diferente de la respuesta presentada por las ratas del grupo control (Figura 2).

En la administración local del extracto EHHLF, después de seis horas las dosis evaluadas de 300, 562.23 y 1000 µg/pata, presentaron actividad antiinflamatoria de 5.58±7.62, 36.19±5.43 y 43.36±3.18%, respectivamente. La prueba de comparación múltiple de medias de Newman-Keuls, indica que la actividad antiinflamatoria de los extractos administrados en dosis de 562.23 y 1000 µg/pata, fueron significativamente similares a la del grupo que recibió naproxeno 45.71±16.42 % (Figura 3).

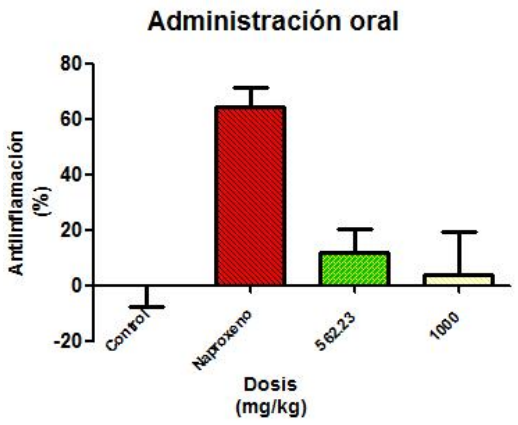


Figura 2. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroetanolico de hojas de *Laelia furfuracea.* Administración vía oral, *p<0.05

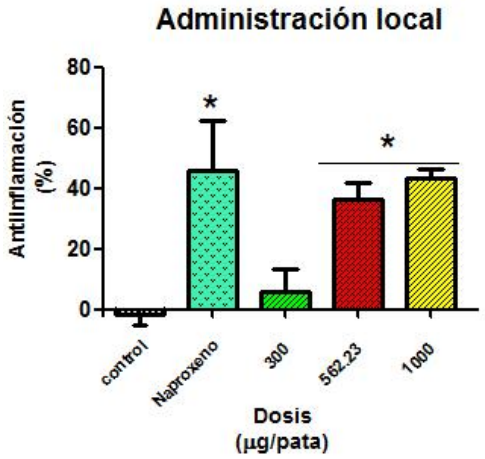


Figura 3. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroetanolico de hojas de *Laelia furfuracea.* Administración vía local, *p<0.05

Las fracciones FC, FAE, FB y FA del extracto hidroetanolico de hojas de *L. furfuracea*, no presentaron actividad antiinflamatoria; sin embargo, la fracción FH tuvo una actividad

antiinflamatoria de 20.23% ±9.17, la cual no fue estadisticamente diferente de la del grupo control (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación antiinflamatoria de fracciones (FH, FC, FAE, FB y FA) de hojas de *L. furfuracea*

Grupos tratados	Naproxeno	FH	FC	FAE	FB	FA
Antiinflamación (%)±EE	45.71±16.4	**20.23±9.17**	1.50±10.6	-38.36±12.2	-7.05±6.2	0.47±11.8

Antiinflamacion±EE (Error estándar); FH (Fracción hexanica); FC (Fracción clorofórmica); FAE (Fracción de acetato de etilo); FB (Fracción butanolica) y FA (fracción acuosa)

4.3.4 Actividad antioxidante in vivo

Medida de óxido nítrico (NO) en la pata

Las concentraciones de $NaNO_2$ determinadas en los grupos de tratamiento de extracto EHHLF con las dosis de 562.23 y 1000 µg/pata fueron de 34.12±1.87 y 28.25±4.84 µM de $NaNO_2$/g de tejido, dichas concentraciones son mayores a las que presentó el grupo basal e incluso al grupo control (Cuadro 4), no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Medida de Glutatión reducido (GSH) en la pata

Las concentraciones de GSH determinadas en los tejidos de los grupos de ratas que recibieron el extracto EHHLF con las dosis de 562.23 y 1000 µg/pata fueron menores a las del grupo basal e incluso al grupo control, no habiendo diferencia estadística entre los grupos de tratamiento y el basal. Pero si entre el grupo control y el basal con un $p<0.05$ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del extracto EHHLF sobre los niveles de NO y GSH

Grupo	**Parámetro bioquímico**	
	Concentración de nitritos (µM de $NaNO_2$/ g)	**Glutatión reducido (nM de GSH/g)**
562.23 µg/pata EHHLF	34.12±1.87	3.33±127.2
1000 µg/pata EHHLF	28.25±4.84	3.00±107.3
Control	28.07±3.96	3.33±51.64
Basal	8.42±1.48	5.22±1083

EHHLF (Extracto hidroetanolico de hojas de *Laelia furfuracea*)

4.3.5 Compuestos fenólicos por HPLC-MS

El análisis por HPLC-MS confirmó la presencia de compuestos fenólicos previamente detectados en el perfil fitoquímico preliminar de las fracciones. Algunos de los compuestos detectables en la fracción FH, de acuerdo a su masa molar, son el 4-hydroxybenzyl alcohol (BHA), ácido málico, ácido cafeico y ácido siringico acetato, cuyas masas son de 107.130, 134.0874, 180.0423 y 239.0571, respectivamente. Que corresponden a los compuestos polares que salen al inicio de los cromatogramas (Figura 4).

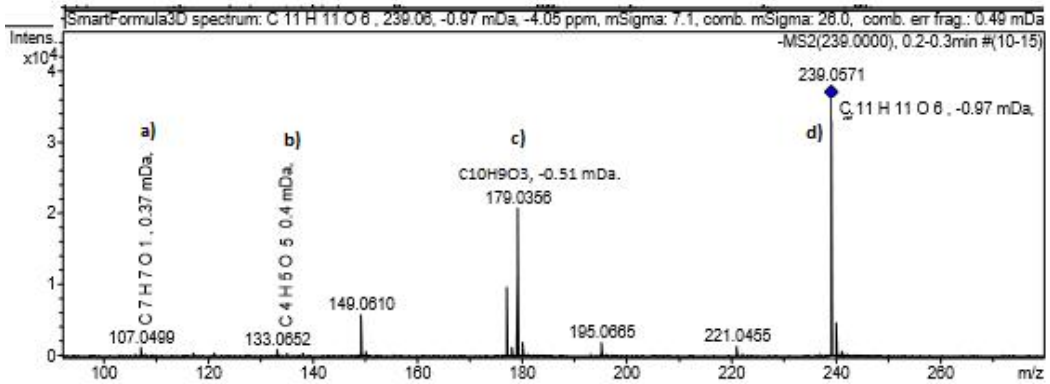


Figura 4.Cromatogramas de HPLC-MS de la fracción hexanica del extracto hidroetanolico de hojas de *Laelia furfuracea*. Compuestos detectados de acuerdo a masas a) 4-hydroxybenzyl alcohol (107.130), b) ácido málico (134.0874), c) ácido cafeico (180.0423) y d) ácido siringico acetato (239.0571).

4.4 Discusión

De acuerdo a la organización mundial de la salud, tres cuartas partes de la población mundial depende de la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades y control de desórdenes inflamatorias (Gacche *et al*., 2011). Hay una necesidad clínica de encontrar nuevas fuentes naturales de compuestos para la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias (Hur *et al*., 2012).

Las plantas medicinales son una alternativa para el descubrimiento de nuevos compuestos fenólicos bioactivos (Gautam y Jachak, 2009), estos metabolitos secundarios son sintetizados por las plantas (Ghulam *et al*., 2013, Mohamad *et al*., 2013) para protegerlas

de la radiación UV, ataque por patógenos y para contrarestar el estrés del medio ambiente en el que se encuentran.

Los recientes aportes en investigaciones en diferentes especies de orquideas documentan el uso medicinal tradicional en el mundo, esto representa el primer paso para investigaciones futuras que avalen el uso medicinal tradicional (Musharof, 2011). Chinsamy y colaboradores (2014) validarón el uso de ciertas especies de orquideas utilizadas en la medicina tradicional del sur de África relacionados con la inflamación y desordenes degenerativos.

En el extracto EHHLF y fracciones de hojas se demostró a través del perfil fitoquímico la presencia de flavonoides, saponinas, taninos, cardiotónicos, quinonas y sesquiterpenlactonas. Flavonoides y taninos son polifenoles, los polifenoles son conocidos como potentes antioxidantes en las plantas (Kanti *et al*., 2009) poseen propiedades biológicas como antioxidante, antiapoptosis, anticarcinógeno, antiinflamatorio, antiarterosclerosis y protección cardiovascular (Sandhyarani, 2011). Los flavonoides son potentes antioxidantes; con efecto antiinflamatorio, antifúngico (Gerritsen *et al.*, 1995) y cicatrizante de heridas *(*de Gaspi *et al*., 2011*),* además no solo atrapan las especies reactivas de oxigeno (ROS), sino también inhiben la formación de enzimas o elementos traza que participan en la generación de radicales libres (Banafsheh y Sirous., 2016). Las quinonas presentan también efecto antioxidantes (Kosalec *et al*., 2012), los glucosidos cardiotónicos regulan desordenes cardiacos (Lalit *et al*., 2011) y las saponinas producen hemólisis sobre los eritrocitos (Carretero, 2000). Los resultados obtenidos permiten avalar el uso medicinal que se le atribuye a *L. furfuracea* y permite potencializar el uso farmacológico de esta especie.

De acuerdo a Scherer y Godoy (2009), una pobre actividad antioxidante presenta un IAA<0.5, moderada actividad cuando IAA<1.0, fuerte actividad cuando IAA<2.0 y muy fuerte actividad antioxidante cuando IAA>2. El extracto EHHLF y fracciones FC, FAE, de hojas de *L. furfuracea* demostraron tener una fuerte actividad antioxidante (IAA) de 1.328, 1.408 y 4.1, respectivamente; las fracciones FH y FB presentaron moderada actividad y la fracción FA presentó pobre actividad antioxidante. La actividad antioxidante en el extracto EHHLF y fracciones podria estar relacionado con la concentración de flavonoides y fenoles totales. La actividad antioxidiante que presenta *L. furfuracea* está en proporción a las concentraciones de flavonoides y fenoles totales de 129.96, 198.16 y 503.58 mg EqQ/g; y 394.76, 282.8 y 612.48 mg EqAG/g, respectivamente. Concentraciones similares de flavonoides y fenoles fueron detectados en *P. michuacana* (Narváez *et al*., 2007), *Dendrobium speciosum* (Lo *et al.,* 2004; Moreti *et al*., 2012), y en *Oncidium sphacelatum* (Hernández-Galicia, 2010).

El extracto EHHLF de las hojas de *Laelia furfuracea* es un buen antiinflamatorio, presentó inhibición de la inflamación en un 36.19 y 43.3% en las dosis de 562.23 y 1000 µg/pata. El efecto es similar al del naproxeno que inhibió un 45.7% en el grupo de ratas evaluadas. El efecto de inhibición de la dosis de 1000 µg/pata del extracto EHHLF, son similares a los que presentó el extracto metanólico de bulbos de *Eulophia ochreata* (orquidea) que disminuyó el edema en un 48 y 53% en dosis de 500 y 1000 µg/kg, respectivamente (Jagtap et al., 2009; Rajendra et al., 2010). También en *Gastrodia elata* se reporta un potente efecto antiinflamatorio de los compuestos fenólicos aislados (Lee et al., 2006).

El extracto EHHLF no ayuda a neutralizar el exceso de radicales libres que causan el daño celular por la via del NO y GSH, el efecto antiinflamatorio puede estar relacionado con la actividad antioxidante de compuestos naturales exógenos altamente protectores del extracto (Banafsheh *et al*., 2016).

La actividad antiinflamatoria que presentó el extracto EHHLF de *L. furfuracea* posiblemente se deba a un efecto sinérgico de la interacción de los compuestos 4-hydroxybenzyl alcohol (HBA) uno de los compuestos fenólicos presente en la orquidea *Gastrodia elata* (Lee *et al*., 2006; Ahn *et al*., 2007) y otras plantas, al que se le ha demostrado que posee actividad anti-angiogenica, anti-inflamatoria y antinociceptiva (Lim et al., 2007), ácido málico; ácido cafeico al que se le atribuye actividad antioxidante (Michaluart *et al*, 1999; Rao *et al*, 1992), antiinflamatoria (Chen *et al*., 2001) y actividad anti-cancerígena (Fesen *et al*., 1993); y ácido siringico acetato que también se le ha demostrado un potente efecto antiinflamatorio (Fernandez et al., 1998), que fueron detectados y a la acción de elementos traza no detectados que se encuentran en el extracto. En los resultados obtenidos no hay una relacion entre a mayor actividad antioxidante mayor efecto biológico. Los compuestos activos con poder antiinflamatorio aislados de especies de orquidias representan un número importante. Trabajos publicados en la orquidea *Gastrodia elata* demostraron que el 4-hydroxybenzyl alcohol presentó un potente efecto antiinflamatorio, anti-angiogenico y analgésico (Lee *et al*., 2006; Ahn *et al*., 2007). En *Eulophia ochreata* y en *Laelia anceps* le atribuyen el efecto antiinflamatorio al fenantreno 9,10-Dihydro-2,5-Dimethoxyphenanthrene-1,7-diol (Yogesh et al., 2013) y flavonol 5-hidroxi, 3,7,4´-trimetoxiflavonol (Jimarez-Montiel, 2009), también polifenoles.

4.6 Literatura citada

Ahn E.K, Jeon H.J, Lim E.J, Jung H.J y Park E.H. 2007. Anti-inflammatoryand anti-angiogenic activities of Gastrodia elata Blume. J. Ethnopharmacol. 3: 476-82.

Alberto MR, Nieva MIM, Zampini IC, Isla MI. 2007. Actividad antiinflamatoria de flavonoides naturales estructuralmente relacionados. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6:313-314

Alcalde, S.M. B., Flores, M.L., Cordoba, O.L., Taira, C.A. y Gorzalczany. 2013. Antinociceptive and anti-in fl ammatory activities of an aqueous extract of Chiliotrichum diffusum. Revista Brasileira de Farmacognosia. 23(4):699-705.

Arunachalam, G., Chattopadhyay, Chatterjee, S., Mandal, A.B., Sur, T.K. y Mandal, S.C. 2002. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC. Leaf extract. Phytomedicine. 9. 632-635

Banafsheh Amir Aslani y Sirous Ghobadi. 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the inmune system. Life sciences. 146:163-173.

Brand-Williams,W; Cuvelier, M.E; Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol,* 28: 25-30.

Carlsen, H. M.; Halvorsen, B. L. Holte, K.; Bohn, S. K.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; Barikmo, I. E.; Berhe, N.; Willett, W. C.; Phillips, K. M.; Jacobs, D. R. and Blomhoff, R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. Nutr. J. 9:3-13.

Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., Pezzi, V. 2013. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies. Mol. Nutr. Food Res., 57, 71−83.

Chang, C.C; Yang, M.H; Wen, H.M; Chern, J.C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis,* 10(3): 178-182.

Chinsamy, M., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2014. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterasa activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. South African Journal of Botany. 91. 88-89.

Cox, L.D. T. 2013. Orquideas: Importancia y uso en México. Bioagrociencias. Vol. 6:2. 4-7.

Cruz, G.G., Solano, G.R. y Lagunez, R.L. 2014. Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico. Brazilian Journak of Pharmacognosy. 24. 153-158.

Cruz-Garcia, G., Lagunez-Rivera, L., Chavez-Angeles, M.G. y Solano-Gomez, R. 2015. The Wild Orchid Trade in a Mexican Local Market: Diversity and Economics. Economic Botany. DOI 10.1007/s12231-015-9321-z

da Silva, A.O., Damaceno, A.A., Almeida, D.A., Balogun, S.O., de Oliveira, R.G., Aires, A.A., Soares, I.M., Marson, A.P.,Ascéncio, S.D. y de Oliveira, M.D.T. 2014. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of Macrosiphonia longiflora (Desf.) Müll.Arg. Journal of etnhopharmacology. 154: 319-329.

Deanne, J. B., 2005. Vainilla as a Medicinal Plant. Semin Integr Med. 3:129-131

Ellman GL. Tissue Sulfhydryl groups, Arch Biochem Biophys. 1959; 82: 70-77.

Enciso, E & Arroyo, J. 2011. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac med,* 72(4): 231-7.

Esch M. 2000. Investigation of the efficacy of a poly- vinil-pyrrolidone-iodine complex for treatment of digital dermatitis in dairy cows (poster) Proceeding XI International Symposium on dissorders of the ruminant digit. Parma. Italy.

Fernandez M.A, Saenz M.T. y Garcia M.D. 1998. Anti-inflammatory activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*. J. Pharm. Pharmacol. 50:1183-1186.

Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O2-), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem 272: 18515 - 18517.

Gacche RN, Shaikh RU, Pund MM, Deshmukh RR. Cyclooxygenase inhibitory, cytotoxicity and free radical scavenging activities of selected medicinal plants used in indian traditional medicine. Pharmacog J. 2011; 1:57-64.

Gautam R, Jachak SM, Saklani A. 2011. Anti- inflammatory effect of Ajuga bracteosa Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition. J Ethnopharmacol 133: 928 - 930.

Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA. 1995. Flavonoids Inhibit Cytokine-induced Endothelial Cell Adhesion Protein Gene Expression. Am J Pathol 147: 278 - 292.

Ghulam F, Nighat A, Abdul M, Muhammad AV, Nazia F, Mehreen L, Lubna I, Uzma RM and Rasool BT. 2013. PhytochemicalSscreening, Total Phenolic Contents and Biological Evaluation of Aerial Parts of *Nepeta praetervisa*.

González, M.C., Ospina, L.F., Calle, J. y Rincón, J. 2007. Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica.

González, M.C.G., Ospina, L.F.G. y Rincón, J.V. 2011. Actividad antiinflamatoria de extractos y Fracciones de *Myrcianthes leucoxila, Calea prunifolia, Curatella americana y Physalis peruviana* en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por Carragenina y artritis inducida por colágeno. Biosalud. 10:1. 9-18.

Hagsater, E., Soto-Arenas, M.A., Salazar, G., Jiménez-Machorro, R., Lopez-Rosas, M., Dressler, R.L., 2005. Las Orquideas de México. Redacta, México.

Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London: Chapman and Hall; 1998, p. 54-84

Hernández, G.G. 2010. Fitoquímica y evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de extractos orgánicos y compuestos aislados de hojas de *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 48-60

Hespporte L.I., Barbosa D.V-C., Araújo P.M., Gois A.L.T.R., de Oliveira I.M.S., Ann M.F., de Carvalho J.E. y Ferreira R.A.R. 2015. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromhetane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. Hindawi.vol. 2015, article ID 948737, 8 pages. Doi.org/10.1155/2015/948737.

Huo X., Zhang L., Gao L., Guo Y., Zhang L., Li L., Si J. y Cao Li. 2015. Antiinflamatory and analgesic activities of etanol extract and isolated compounds from *Millettia pulchra*. Biological and pharmaceutical. DOI:10.1248/bpb.b15-00187.

Hur, S.J., Kang, S.H., Jung, H.S., -kimb, S.C., Jeon, H.S., Kim, I.H., Lee, J.D., 2012. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. Nutrition Research 32, 801-816

Ibarra-Estrada, E; Pacheco-Sánchez, M; García-Mateos, R; San Miguel-Chávez, R; Ramírez-Valverde, G; Soto-Hernández, R.M. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana Miller. Revista Fitotecnia Mexicana,* 34 (4): 241-246.

Jagtap, S. Gilda, P. Bhondave, A. Pradkar, P. Pawar, A. Harsulkar. 2009. Validation of the potential of Eulophia ochreata L. tubers for its anti-inflammatory and antioxidant activity. Pharmacologyonline 2; 307-316.

Jimarez, M.J.M. 2009. Fitoquímica y determinación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de compuestos y extractos orgánicos de las hojas de *Laelia anceps* Lindl. (Orchideceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 30-43.

Jimarez, M.J.M. 2009. Fitoquímica y determinación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de compuestos y extractos orgánicos de las hojas de *Laelia anceps* Lindl. (Orchideceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 30-43.

Kim S, Kim Y, Kim JE, Cho KH, Chung JH. 2008. Berberine inhibits TPA-induced MMP-9 and IL-6 expression in normal human keratinocytes. Phytomedicine 15: 340 - 347.

Kokate KC. Practical pharmacognosy. 4th ed. Delhi: Vallabh Prakashan; 1997, p. 218.

Lee J.Y, Jang Y.W, Kang H.S, Moon H, Sim S.S y Kim C.J. 2006. Anti-inflammatory action of phenolic compounds from Gastrodia elata root. Arch Pharm Res. 10: 849-58.

Lim E.J, Kang H.J, Jung H.J y Park E.H. 2007. Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of 4-hydroxybenzyl alcohol. J. Pharm Pharmacol 9:1235-40.

Mohammad AH, Khulood AS, Zawan H, Afaf MW and Qasim Al-R. 2013. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown Thymus vulgaris. Asian Pac. J Trop. Biomedic. 3(9):705-710

Moretti, M; Cossignani, L; Messina, F; Dominici, L; Villarini, M; Curini, M; Marcotullio, M.C. (2012). Antigenotoxic effect, composition and antioxidant activity of Dendrobium speciosum. *Food Chemistry.* 1-6.

Musharof, H. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances- An overview. Fitoterapia. 82: 102-140.

Narváez-Mastache, J.M; Soto, C; Delgado, G. (2007). Antioxidant evaluation of *Eysenhardtia* species (*Fabaceae*): Relay synthesis of 3-Oacetyl- 11α, 12 α-epoxy-oleanan-28,13 β-olide isolated E. platycarpa and its Protective Effect in Experimental Diabetes. *Biological Fharmacy Bull,* 30: 1503-10.

Neira, A.M.G. 2009. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana.* Instituto Politécnico Nacional.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. J Nat Prod 66: 1022 - 1037.

Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. WHO/EDM/TRM/ 2002.1. Ginebra.

Özlem B, Gülcin SC, Hanefi Ö, Stefano DA, Jan H and Karel ¨S. 2011. Hepatoprotective and TNF-a inhibitory activity of Zosima absinthifolia extracts and coumarins. Fitoterapia. 82:454-459

Perez- Gutiérrez, R.M., Sosa, A.I., Vadillo, H.C. y Victoria, T.C. 2011. Research of Natural Product Laboratory, School of Chemical Engineering. Vol. 49 (11), pp. 1121.

Rajendra D. Kshirsagar, Yogesh B. Kanekar, Suresh D. Jagtap, Shakti N. Upadhyay, Rajesh Rao, Sandip P. Bhujbal, Jagdish N. Kedia. 2010. Phenanthrenes of Eulophia ochreata Lindl. International Journal of Green Pharmacy.

Rocha, H.I.G., Blaisdell, E.L., Granados, V.S y Navarrete, A. 2010. Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin isolated from Heterotheca inuloides: Role of peripheral 5-HT1 serotonergic receptors. European Journal of Pharmacology. 649. 154-160.

Rodrigues AMC, Nayrton FMR, Freire LV, Vasconcelos ERR, Leite MD, Gomes MIS, de Franca MMF, Barbosa JMF, Chavez SJG and Florenco FCS. 2013. Evaluation ofthe anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. Chemico-biological Interactions. 205:165-172.

Salazar-Rojas, V. M.; Herrera-Cabrera, B. E.; Flores, Palacios, A. y Ocampo-Fletes, I. 2007. Uso tradicional y conservación de la “calaverita” *Laelia aceps subsp. Dawson* ii F. Chilapensis Soto- Arenas en la región de Chilapa, Guerrero. Costa Rica. Lankesteriana. 7(1-2):368-370.

Sameena B, Kalim J, Shamim A, Rathish IG, Surender S, Chaitanya M, Arunasree KM and Alam MS. 2013. Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. European Journal of Medicinal Chemistry. 65:51-59

Sánchez PWF, Pérez JCC, Méndez AJJ, Murillo AW, Ospina GLF. 2014. Caracterizacion química preliminar y evaluacion de la actividad antioxidante in vitro y antiinflamatoria in vivo de los extractos y fracciones de diferente polaridad de *Mollinedia racemosa* (Romadizo). Vitae. 21:S75-S76

Sayajit D.S., Zahid L., and Alexander I.G. 2006. Natural Products isolation. Ed. HUMANA PRESS. 2ª Edicion.

Scherer, R & Godoy, H.T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*,112: 654–658.

Setty AR, Sigal LH. 2005. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. Semminars Arthritis Rheum 34: 773 - 784.

Siverio, M.D., Vicet, L.M., Rivero, Y.G., Sueiro, L.O., Marrero, Y.P. y Aran, V.J. 2009. Assessment of the in vivo antiinflammatory activity of novel 5-nitroindazolinones.

Soto Arenas, G.A., Salazar-Chávez .R. Jiménez Machorro Boletín de la Sociedad Botánica de México, núm. 78, junio, 2006, pp. 121-124, Sociedad Botánica de México México

Tarpey M.M, Wink D.A, Grisham M.B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: invitro and invivo considerations. AmJPhysiol Regul Integr Comp Physiol. 2004; 286:R431– R444.PMID

To Dao C., Tran M.H., Joo S.L., Kwon Y.W., Mi H.W., Byung S.M. 2015. Anti-inflammatory activity of phenolic compounds from the whole plant of Scutellaria indica. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 25: 1129-1134.

Toffoli, M.C.K., Alexandre, C.C., Dias, L.L., Lousada, J.F., Bradini, J.E.N., Campos, L.G.W., Sousa, G.M.R., Rodriguez, J.L., Penteado, V.N.F., Do Carmo M.V. y Joáo, M.S. 2014. In vivo and in

vitro anti-inflammatory propertis of Achyrocline alata (Kunth) DC. Journal of Ethnopharmacology. 153:461-468.

Tomovic M.T., Cupara S.M., Popovic M.T., Ljujic B.T., Kostic M.J. y Jankovic S.M. 2015. Antioxidant and anti-inflamatory activity of *Potentilla reptans L*. Poloniae Pharmaceutica. 72: 137-145.

Turkmen, N; Sari, F; Velioglu, S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry,* 93: 713–718.

Vergara, J.G., Rolffy, O. A., Patricia, C.E., Ibarra, M.B., Itzel, G.O., Villalobos, R.M. y Estrada, S.S. 2008. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium cannel blockade. Vascular Pharmacologhy. 49. 26-31.

Vergara, J.G., Rolffy, O. A., Rivera, J.L., Patricia, C.E., Ibarra, M.B., Villalobos, R.M., Itzel, G.O. y Estrada, S.S. 2010. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of Laelia anceps are mediated by calcicum-channel antagonism. Fitoterapia. 81 . 350-357.

Wagner H and Bladt S. Plan Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. 2ª.ed. 2001.

Wang, Q., Kuang, H., Su, Y., Feng, J., Guo, R.,Chan, K., 2013. Naturally derived anti-inflammatory compounds from chinese medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 146, 9-39.

Wiart, C. 2007. Anti-inflammatory plants. In: ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific. Ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Chapter 1. 1-56 pp

Winter CA, Porter CA. 1957. Effect of alteration in side chain uppon antiinflamatory and liver glycogens activities of hydrocortisone esters. J Am Pharm Sc 46: 515 - 519.

Woisky, R & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Res Journal of Apicultural*, 37(2): 99-105.

Yogesh Kanekar, Khalander Basha, Sharad Duche, Rajan Gupte, Arnarb Kapat. 2013. Regioselective synthesis of phenanthrenes and evaluation of their anti-oxidant based anti-inflammatory potential. European Journal of Medicinal Chemistry 67:454-463.

Zhao T, Jun H, Xiaoxue W, Bingzhi M, Xiaoxing W, Lei Z, Pingi L, Ning L, Jin L and Xianglin Z. 2014. Rapid detection and characterization of major phenolic compounds in Radix Actinidia chinensis Planch by ultra-performance liquid chromatography tándem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 98:311-320.

CAPITULO V

CONCLUSIÓN

Laelia furfuracea presentó compuestos fitoquímicos bioactivos principalmente polifenoles de origen flavonoides y acidos fenólicos como el 4-hydroxybenzyl alcohol, ácido málico, ácido cafeico y ácido siringico acetato. Fuerte actividad antioxidante y altas concentraciones de flavonoides y fenoles totales. Además, se demostró que el extracto de hojas genera actividad antiinflamatoria positiva, por tanto, representaría un aval en el uso de la medicina tradicional, además que, podria ser una especie promisoria para el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

ANEXOS

Figura 5. *Laelia furfuracea* en su hábitat natural

Figura 6. Extracción de materia prima de hojas de *Laelia furfuracea* con equipo Soxhlet a gran escala

Figura 7. Perfil fitoquímico de extractos de flores, pseudobulbos y fracciones de FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *Laelia furfuracea*

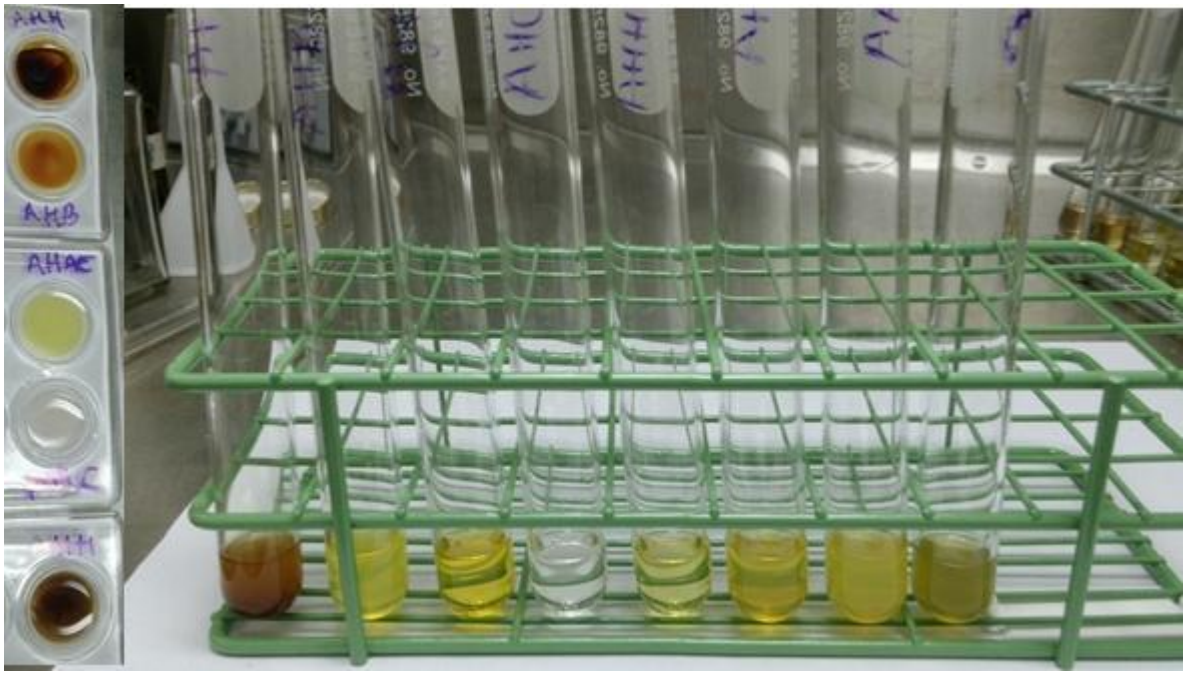


Figura 8. Cromatografías en capa fina de extractos de flores, pseudobulbos y fracciones de FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *Laelia furfuracea* con revelador NP/PEG

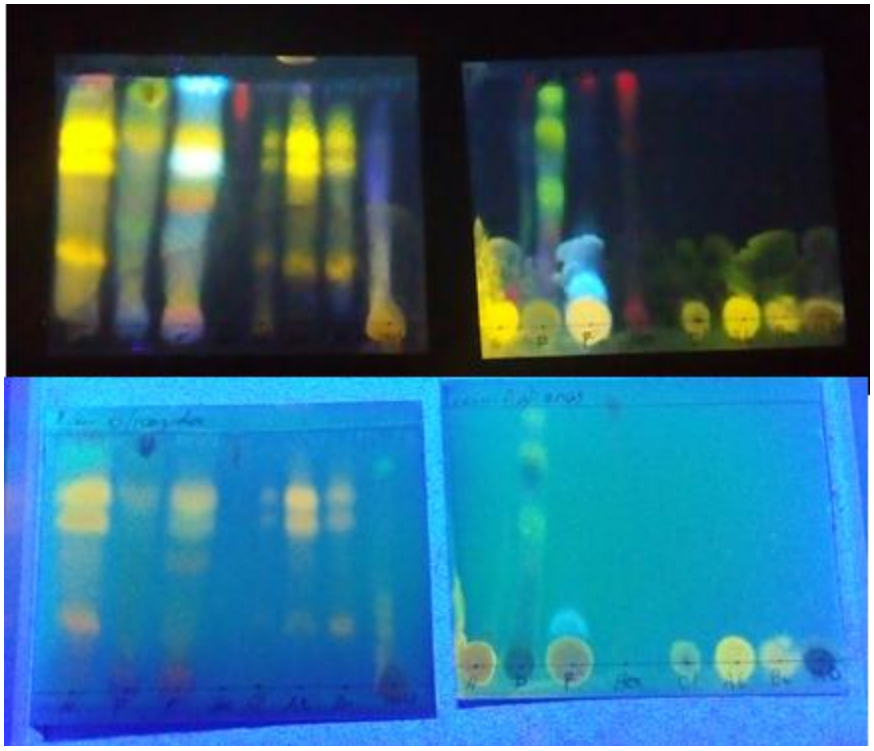


Figura 9. Administración de extracto y medición del edema en la pata de la rata

Figura 10. Determinación de NO y GSH en tejidos de las patas

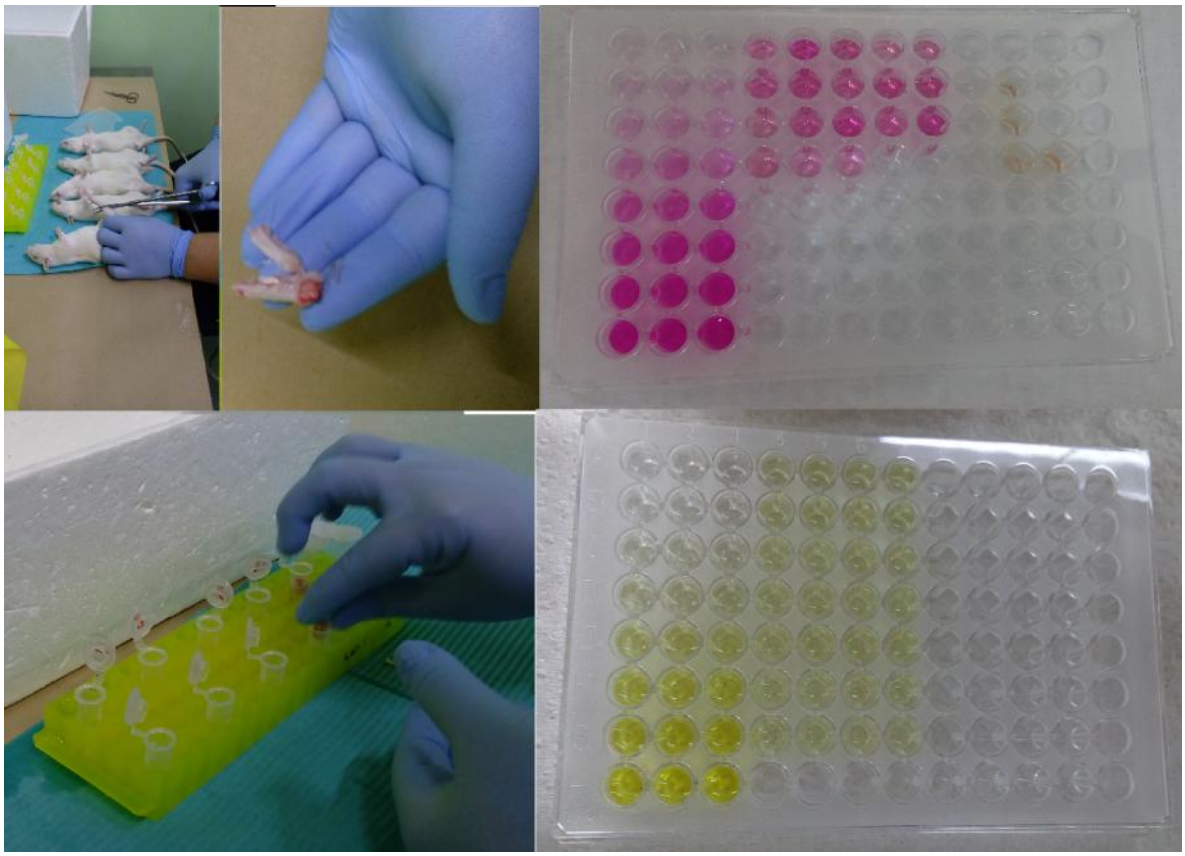


Figura 11. Comparación de cromatogramas de fracciones FH, FC, FAE, FB y FA de hojas de *Laelia furfuracea*

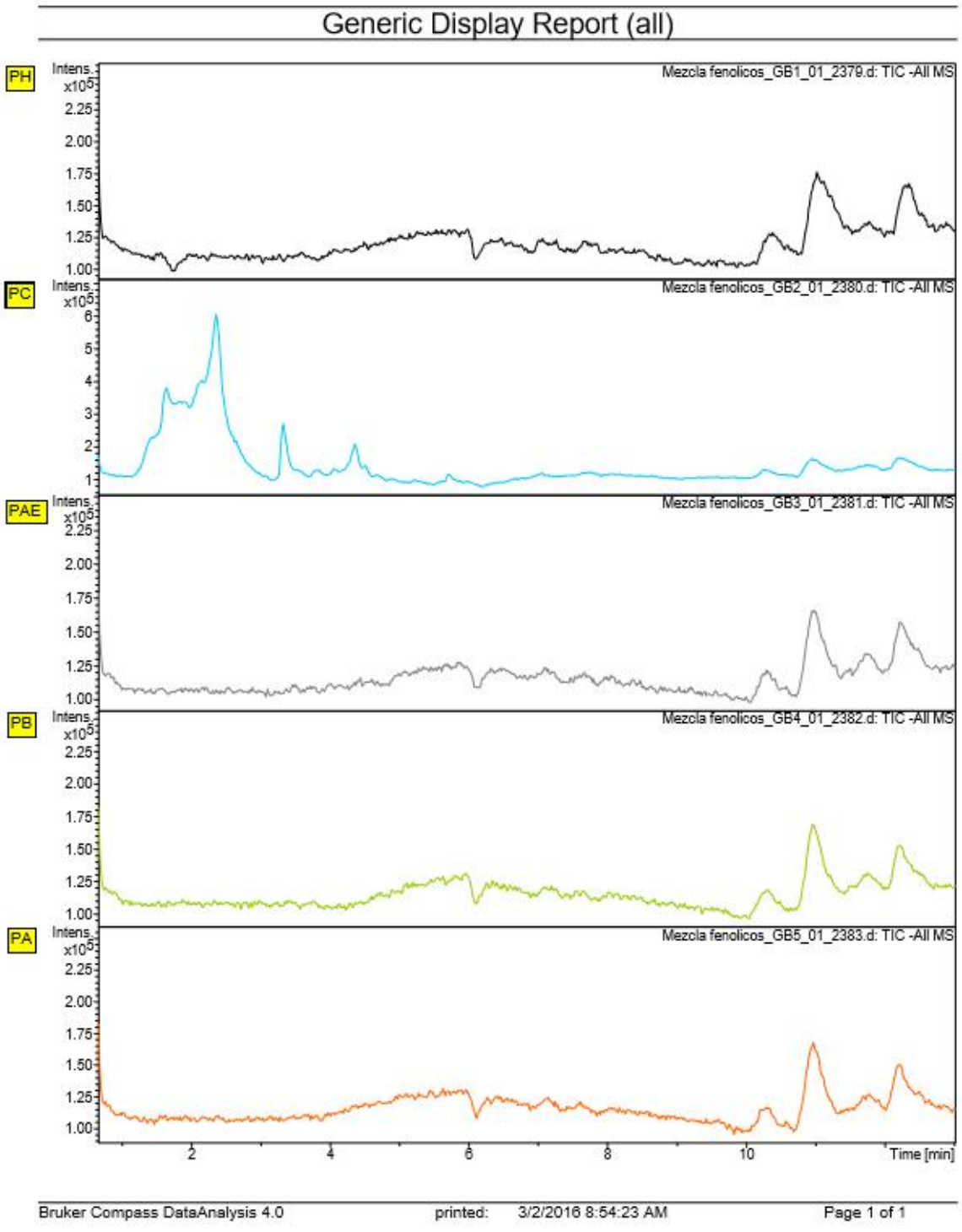
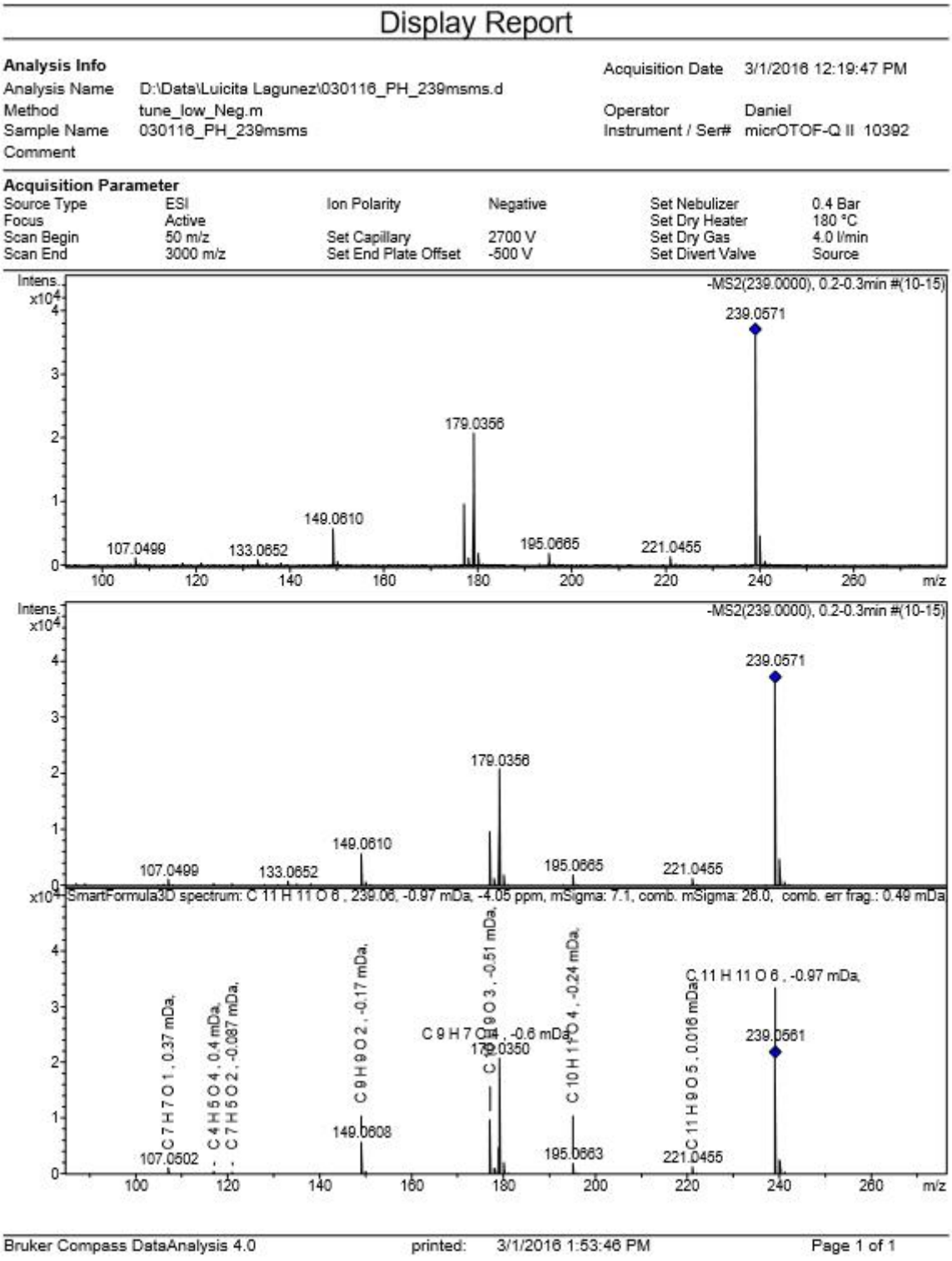



Figura 12. Masas de fracción FH de hojas de *Laelia furfuracea*