CS 2018.01.01.8

Bionatura Conference Series Vol 1. No 1. 2018

Publicación del IV CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIODIVERSIDAD IV CIBB y XV FORO INTERNACIONAL BANANERO

INVESTIGATION / RESEARCH

[Previos](#) / [Index](#) / [Next](#)

Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea*

Phytochemical study, antioxidant activity of orchid species of the genera *Epidendrum*, *Oncidium* and *Caucaea*

Marco Cerna¹, Fernando Mencias², Telmo Salazar³ Sara Gutiérrez⁴

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/CS/2018.01.01.8>

RESUMEN

En la presente investigación se tuvo como objetivo identificar metabolitos secundarios en extractos etanólicos de distintas especies de géneros de orquídeas mediante un screening fitoquímico, en donde se realizaron pruebas para alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos. Además, se evaluó la capacidad antioxidante de 35 especies de orquídeas de los géneros *Caucaea*, *Epidendrum* y *Oncidium*, para esto se utilizó el método DPPH para analizar la capacidad captadora de radicales libres, como control positivo para este análisis se utilizó vitamina C.

Los resultados determinaron en el screening fitoquímico que los metabolitos secundarios que más presencia tuvieron en las especies estudiadas fueron flavonoides, triterpenos y saponinas. Las especies en estudio del género *Caucaea* y *Oncidium* presentaron reacción positiva para flavonoides y triterpenos en mayor cantidad, mientras que las muestras del género *Epidendrum* presentaron saponinas en un 100 %.

En el análisis de actividad antioxidante con metodología DPPH, las especies más sobresalientes fueron *Oncidium excavatum* y *Epidendrum nocturnum*, la última especie se destacó por que necesitó una concentración de 3,50 ppm para inhibir el 50 % de los radicales libres de DPPH presentes en una solución de ensayo.

Palabras claves: Antioxidante, orquídeas, DPPH, metabolitos, screening.

ABSTRACT

In the present investigation, the objective was to identify secondary metabolites in ethanolic extracts of different species of orchid genera through phytochemical screening, where tests were carried out for alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and triterpenes. In addition, the antioxidant capacity of 35 species of orchids of the genera *Caucaea*, *Epidendrum* and *Oncidium* was evaluated. For this, the DPPH method was used to analyze the free radical scavenging capacity. Vitamin C was used as a positive control for this analysis.

The results determined in the phytochemical screening that the secondary metabolites that had the most presence in the species studied were flavonoids, triterpenes and saponins. The species under study of the genus *Caucaea* and *Oncidium* presented positive reaction for flavonoids and triterpenes in greater quantity, while the sample of the genus *Epidendrum* presented saponins in 100 %.

In the analysis of antioxidant activity with DPPH methodology, the most outstanding species were *Oncidium excavatum* and *Epidendrum nocturnum*, the last species stood out because it needed a concentration of 3,50 ppm to inhibit 50 % of the free radicals of DPPH present in a solution of test

Keywords. Antioxidant, orchids, DPPH, metabolites, screening.

INTRODUCCIÓN.

Las orquídeas pertenecientes a la familia *Orchidaceae*, presentan flores muy llamativas debido a su gama amplia colores, formas y aromas; hasta el momento se han detallado alrededor de 28000 especies, y casi 900 géneros en sus diversas variantes ¹. Endara y Jost ² mencionan que existen 1707 especies de orquídeas endémicas en el Ecuador, por tal motivo Pitman et al ³ dicen que esta familia es

considerada la más diversa de las plantas vasculares.

Se estima que solo cerca del 6 % de plantas superiores han sido estudiadas para comprobar su actividad biológica y de estas el 15 % tiene un estudio fitoquímico; esto provoca el interés de la industria farmacéutica que ve el potencial de las plantas para la elaboración de nuevos medicamentos ⁴.

Los metabolitos secundarios son sustancias complejas, usados como principios activos en la industria farmacéutica, estos presentan una acción farmacológica o fisiológica sobre el organismo, el valor económico de los metabolitos secundarios es muy alto a comparación con los metabolitos primarios⁵.

Los antioxidantes son sustancias que favorecen el retraso del daño a nivel celular causado por la acción oxidativa de los radicales libres⁶.

En la actualidad existe mucho interés en realizar estudios relacionados con los usos etnobotánicos de las plantas, o a su vez para obtener nuevos compuestos con actividad farmacológica, en especial compuestos antioxidantes. Debido a que Ecuador posee una gran diversidad de orquídeas ⁷, que han sido utilizadas en medicina ancestral, se evidencia la falta de estudios científicos que corroboren dichas aplicaciones. Con lo antes mencionado es importante ya que se puede obtener principios activos que reemplacen a compuestos sintéticos utilizados actualmente en la industria farmacéutica⁸.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Recolección de la muestra.

La recolección del material vegetal de los tres géneros: *Caucaea*, *Epidendrum* y *Oncidium*; se realizó en la provincia de Pichincha, ciudad Quito, en la parroquia de El Quinche; en el “Orquideario de Sarina”.

El material vegetal seleccionado para este estudio consistió en 10 g de hojas de

cada especie, se cortaron las hojas con una tijera de podar previamente flameada y esterilizada con alcohol al 96 %, el material fue colocado en bolsas de papel y almacenadas en fundas plásticas con sierra para absorber la humedad se añadió silicagel a la funda.

Obtención del extracto etanólico.

El extracto se obtuvo mediante maceración de acuerdo a la metodología descrita por Moreno y Jaramillo ⁹, el proceso consistió en: tomar 10 g de hojas jóvenes de cada una de las especies en estudio, se trituró en un mortero de porcelana de 80 mm de diámetro, se añadió 70 mL de etanol 96 % y se maceró en un frasco ámbar durante 8 días en condiciones ambientales y completa oscuridad. Luego se tamizó con papel filtro para eliminar los residuos de hojas y se almacenó en la oscuridad en condiciones ambientales para evitar la degradación de las moléculas presentes en los extractos a analizar.

Screening fitoquímico. Test para alcaloides.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Carrera et al ¹⁰, mediante el uso del reactivo de Dragendorff; para lo cual se colocó 2 mL de muestra en un tubo de ensayo, luego se agregó de 2 a 3 gotas del reactivo de dragendorff, se agitó fuertemente y se esperó por 30 minutos.

Se utilizó como control negativo alcohol al 96 % y como control positivo cafeína.

Si se observa opalescencia (+), turbidez (++) o precipitado (+++) se considera que la muestra contiene alcaloides.

Determinación de flavonoides.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Ramos et al¹¹, mediante el uso del reactivo de Shinoda; para lo cual se colocó 2 mL de muestra en un tubo de ensayo, luego se agregó varias limaduras de magnesio, los tubos de ensayo se los colocó en un baño maría a 60 °C, después se colocó 2 gotas de HCl

concentrado.

Test de saponinas.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Moreno y Jaramillo ⁹, mediante la prueba de espuma; para lo cual se colocó 2 mL de muestra en un tubo de ensayo, luego se agregó 5 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente durante un minuto.

Test de taninos.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Bravo y Acuña ¹², mediante el uso del reactivo Gelatina-Sal; para lo cual se colocó 1 mL de muestra en un tubo de ensayo, luego se adicionó 1 mL de reactivo.

Test de triterpenos.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Carrera et al ¹⁰, mediante el uso del reactivo de Liebermann-Burchard; para lo cual se colocó 1 mL de muestra en un tubo de ensayo, luego se adicionó lentamente por la pared del tubo 1 mL de anhídrido acético, finalmente con precaución se añadió 1-2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Evaluación de la actividad antioxidante.

Para este ensayo se aplicó la técnica propuesta por Noriega et al ¹³, para lo cual se elaboró una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH (1×10^{-4} en etanol), como control positivo se usó vitamina C. Para cada extracto se preparó diluciones en diferentes concentraciones: 10 uL, 50 uL y 80 uL en viales ámbar, se completó con alcohol al 96 % obteniendo un volumen final de 100 uL; a las diluciones realizadas se les agregó 2,9 mL de DPPH hasta completar el volumen final de 3 mL y se homogeniza, luego se almacena en la oscuridad durante 30 minutos.

Las muestras se colocaron en celdas plásticas y se analizó tres veces en el espectrofotómetro de UV-visible (JASCO V-730) con el programa spectral manager, a 517nm de longitud de onda. Previamente el espectrofotómetro fue encendido con alcohol al 96 %.

Las soluciones preparadas se colocaron en viales ámbar y a estas se les añadió 2,9 mL de DPPH preparado previamente, se agitó y almacenó en la oscuridad por 30 minutos.

Las soluciones preparadas se colocaron en celdas plásticas de 3 mL para ser analizadas en el espectrofotómetro (JASCO V-730) a una longitud de onda 517 nm, se analizaron las muestras en orden creciente de su concentración, cada muestra se analizó por triplicado.

RESULTADOS

Identificación de metabolitos secundarios

Mediante las pruebas colorimétricas se identificó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos en las orquídeas colectadas, usando la técnica cualitativa del Manual de Miranda y Cuellar ¹⁴.

Screening fitoquímico género *Caucaea*

El porcentaje de presencia de metabolitos en las especies en estudio del género *Caucaea* fueron: flavonoides y triterpenos en un 100 %, saponinas en un 88 %, alcaloides y taninos con un 44,4 %; no existen otros estudios fitoquímicos del género *Caucaea* debido a que es un género nuevo que fue separado de *Oncidium* y se ha discutido mucho sobre la pertenencia de algunas especies del género *Caucaea* y *Oncidium* como lo señala Szlachetko y Kolanowska¹⁵. Sin embargo, en este trabajo se evidenció la presencia de los mismos grupos de metabolitos: flavonoides y triterpenos en los 2 géneros.

Screening fitoquímico del género *Epidendrum*

El porcentaje de presencia de metabolitos en las especies en estudio del género *Epidendrum* fueron: saponinas 100 %, triterpenos 90,9 %, taninos 63,6 %, flavonoides 45,4 % y alcaloides 0 %, ninguna muestra presentó alcaloides lo que contrasta con el estudio hecho por Sut et al¹⁶, que encontró alcaloides fenantrénicos en especies del género *Epidendrum*; esto indicaría que las especies colectadas no han tenido una amenaza externa que induzca la producción de alcaloides, como lo explica Farrán et al¹⁷.

Screening fitoquímico del género *Oncidium*

El porcentaje de presencia de metabolitos en las especies en estudio del género *Oncidium* fueron: flavonoides y triterpenos 100 %, saponinas 93,3 %, taninos 73,3 %, alcaloides 66,6 %, Amar et al¹⁸ presentan un estudio realizado en *Oncidium baueri*, en el que también se encontró flavonoides y triterpenos. Particularmente en el presente estudio se encontró un alto contenido de flavonoides en las especies *Oncidium excavatum* y *Oncidium* sp1; factor indicador de actividad antioxidante, como lo señala González et al¹⁹. Ver tabla 1.

Resultados metabolitos secundarios

Género	Especies	Metabolitos secundarios					
		Alcaloides	Flavonoides	Saponinas		Taninos	Triterpenos
				1 min	5 min		
Caucaea	Caucaea sp1	-	+	+	-	-	+
	Caucaea sp2	-	+	++	++	++	++
	Caucaea sp3	-	+++	+	+	++	+++
	Caucaea sp4	+	++	++	++	++	+
	Caucaea sp5	-	++	+	+	++	++
	Caucaea sp6	+	++	-	-	-	+
	Caucaea cucullata	-	++	+	+	-	+
	Caucaea nubigena	+	++	++	++	-	+
	Caucaea phalaenopsis	+	+	+	+	-	+
Epidendrum	Epidendrum blepharoclinium	-	-	++	++	+	+
	Epidendrum blepharoclinium blanco	-	-	++	+	-	+
	Epidendrum cochlidium sp1	-	-	++	++	+	+
	Epidendrum cochlidium sp2	-	+++	++	+	+	++
	Epidendrum Jamiesonis	-	-	+	+	+	+
	Epidendrum medusae	-	-	+	+	-	+
	Epidendrum nocturnum	-	+++	+	-	++	-
	Epidendrum paniculatum	-	++	+++	++	-	+++
	Epidendrum porphyreum	-	-	+	+	+	+
	Epidendrum secundum	-	++	+++	+++	-	++
	Epidendrum secundum blanco	-	+	+++	+++	++	+
Oncidium	Oncidium sp1	+	+++	++	++	++	++
	Oncidium sp2	-	+	++	++	++	++
	Oncidium sp3	+	+	++	++	+	++
	Oncidium sp4	-	+	++	++	++	+
	Oncidium sp5	+	++	++	++	++	+
	Oncidium sp6	++	+	++	++	-	+
	Oncidium sp7	-	++	+++	+++	++	+
	Oncidium camilita portilla	++	++	+	+	-	++
	Oncidium excavatum	+	+++	+++	+++	++	+
	Oncidium fuscatum	-	++	-	-	++	++
	Oncidium obryzatum	-	+	+++	+++	+	+
	Oncidium portmannii	++	+	+	+	-	+
	Oncidium seacoanum	+	+	++	++	-	+
	Oncidium strictum	+	++	+	+	+	+
	Oncidium sweet sugar	+	++	+	+	++	+

Nota: Negativo (-), poca presencia (+), moderada presencia (++), alta presencia (+++).

Elaborado por: (Los autores, 2018).

Tabla 1. Resultados metabolitos secundarios

Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos

Actividad antioxidante del género *Caucaea*

Se observó que las especies analizadas de este género no tienen actividad antioxidante significativa ya que ninguna logra sobrepasar el 50 % de inhibición, ver figura 1.

Nota: Curvas de porcentajes de inhibición de radicales libres obtenidas mediante Microsoft Excel

Figura 1. Porcentaje de inhibición del DPPH del género *Caucaea*

Actividad antioxidante del género *Epidendrum*

Entre las especies analizadas se destaca *E. nocturnum* que presentó una capacidad antioxidante del 50 % de los radicales DPPH con una concentración de 3,50 ppm, las demás especies tienen una actividad antioxidante muy baja, ver figura 2.

Nota: Curvas de porcentajes de inhibición de radicales libres obtenidas mediante Microsoft Excel 2013.

Figura 2. Porcentaje de inhibición del DPPH del género *Epidendrum*

Actividad antioxidante del género *Oncidium*

Se puede observar que destacan 2 especies por su potencial antioxidante las cuales son: *O. sp7* y *O. excavatum*, las cuales a una concentración de 43 y 31 ppm respectivamente, reducen el 50 % de los radicales DPPH; las otras especies no tienen una actividad antioxidante significativa, ver figura 3.

Nota: Curvas de porcentajes de inhibición de radicales libres obtenidas mediante Microsoft Excel 2013.

Figura 3. Porcentaje de inhibición del DPPH del género *Oncidium*

Análisis estadístico de la actividad antioxidante

Se realizó un análisis estadístico por conglomerados, el cual se dividió en 3 clústers: poca actividad, moderada actividad y alta actividad. De color rojo el conglomerado 1 nos muestra las especies con poca actividad antioxidante; de color verde el conglomerado 2 muestra especies que tienen una actividad antioxidante moderada y por ultimo de color azul el conglomerado 3 nos muestra especies que tienen una alta actividad antioxidante, ver figura 4.

Nota: Obtenidas mediante Infostat 2018.

Figura 4. Cuadro de clasificación de especies mediante análisis de conglomerados.

El clúster 3 está compuesto de las especies *Epidendrum nocturnum* y *Oncidium*

excavatum; las cuales redujeron el 50 % de los radicales libres de DPPH con tan solo 3,5 y 31 ppm respectivamente lo cual las cataloga como especies con alta actividad antioxidante respecto a las otras muestras.

Se pudo observar que la especie *Epidendrum nocturnum* superó la capacidad antioxidante de *Prosthechea michuacana* reportada por González et al¹⁹ en su estudio “Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*”, que requirió 13,22 ppm para inhibir el % IC50 de DPPH.

Según señala González et al¹⁹ compuestos como los flavonoides influye en el potencial antioxidante de las plantas, lo que confirman los resultados de este ensayo, ya que en el screening fitoquímico de las 2 especies con alta actividad antioxidante presentaron un alto contenido de flavonoides en las pruebas colorimétricas que se realizaron.

CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios encontrados en las especies estudiadas fueron: triterpenos 96,96%, saponinas 96,65%, flavonoides 81,8%, taninos 60,43% y alcaloides 37%.

Las especies estudiadas del género *Caucaea* y *Oncidium* mostraron una estrecha similitud al presentar 2 metabolitos en las especies analizadas, los cuales fueron: flavonoides y triterpenos en un 100% de las especies.

El análisis de actividad antioxidante señaló a 2 especies como las de mayor acción, las cuales fueron *Epidendrum nocturnum* con un % IC50 de 3,5 ppm y *Oncidium excavatum* con un % IC50 de 31 ppm.

Las 2 especies que presentaron una capacidad antioxidante significativa mostraron una presencia alta de flavonoides en su composición, lo que confirma que este metabolito secundario aporta a la capacidad antioxidante de estas plantas.

REFERENCIAS

1. The Plant List. The Plant List: A working list of all plants species [Internet]. 2013 [cited 2018 Feb 2]. Available from:
<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>
2. Endara L, Jost L. Orchidaceae. In: León-yáñez S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa C, Navarrete H, editors. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Segunda. Quito: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2011. p. 80.
3. Pitman N, Valencia R, León-Yáñez S. El libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Segunda. Quito: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2012. 80-85 p.
4. Patiño N. Farmacología médica. México D.F.: Médica Panamericana; 2008. 921-928 p.
5. Cano A, Arnao M. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in different leaves of three lettuce varieties. *Int J Food Prop*. 2005;8(3):521–8.
6. Youngson R. Antioxidantes y radicales libres. Madrid: EDAF; 2003. 112-115 p.
7. Endara L, Williams N, León-Yáñez S. 1. Explorando los patrones de endemismo de las orquídeas ecuatorianas: Implicaciones para su conservación. In: X congreso Latinoamericano de Botánica. La Serena; 2010.
8. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas M, Verde-Star M. Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León: OmniaScience; 2016. 105-121 p.
9. Moreno N, Jaramillo B. Análisis fitoquímico preliminar de *Pachira quinata* (Jacq.) W.S. Alverson, Bogotá, Colombia. *Boletín Semillas Ambient*. 2017;11(1):30–9.
10. Carrera G, Benedito E, Souza-Leal T, Pedroso-De-Moraes C, Gaspi F. Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae). *Rev Bras Plantas Med*. 2014;16(4):938–44.

11. Ramos P, Colareda G, Rosella M, Debenedetti S, Spegazzini E, Consolini A. Phytochemical profile and anti-inflammatory effect of the orchid *Catasetum macroglossum*. *Lat Am J Pharm*. 2012;31(1):62–7.
12. Bravo A, Acuña WD. Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de *Ficus benjamina* L. *Xilema*. 2015;28(1):61–7.
13. Noriega P, Mosquera T, Baldisserotto A, Abad J, Aillon C, Cabezas D, et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil from Leaves of *Cleidion javanicum* Bl. *J Essent Oil Bear Plants* [Internet]. 2012;15(2):29–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2012.10644035>
14. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Primera. La Habana: Universidad de la Habana; 2000. 34-50 p.
15. Szlachetko D, Kolanowska M. Five new species of *Caucaea* (orchidaceae) from Colombia and Ecuador. *Polish Bot J*. 2015;60(2):127–34.
16. Sut S, Maggi F, Dall'Acqua S. Bioactive secondary metabolites from orchids (Orchidaceae). *Chemistry & biodiversity*, 2017. *Chem Biodivers*. 2017;14(11):1–30.
17. Farrán A, López C, Pérez M, Santa María M. Química bioorgánica y productos naturales. Segunda. Claramunt R, editor. Madrid: UNED; 2017. 315-321 p.
18. Amar M, Baba S, Singh A, Singh J, Sembi J, Arora M, et al. A review on phytochemical and pharmacological potential of family orchidaceae. *Artic Int Res J Pharm Mamta Arora al Int Res J Pharm*. 2017;8(10):9–24.
19. González A. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*. Instituto Politécnico Nacional; 2009.

*Marco Cerna*¹, *Fernando Mencias*², *Telmo Salazar*³ *Sara Gutiérrez*⁴

¹ Grupo de investigación Nunkui Wakan, Universidad politécnica Salesiana del

*Ecuador, Carrera de Biotecnología mcerna@ups.edu.ec ORCID ID
<https://orcid.org/0000-0002-0911-9900>*

² *Grupo de investigación Nunkui Wakan, Universidad politécnica Salesiana del Ecuador, Carrera de Biotecnología sdqfernando90@hotmail.com ORCID ID
<https://orcid.org/0000-0001-7495-2053>*

³ *Grupo de investigación Nunkui Wakan, Universidad politécnica Salesiana del Ecuador, Carrera de Biotecnología telmofsp@hotmail.com ORCID ID
<https://orcid.org/0000-0002-2109-5243>*

⁴ *Jardín Botánico “Orquídeas de Sarina” el Quinche, Quito - Ecuador,
atrujillo166@hotmail.com*