



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**

FACULTAD DE FARMACIA

MAESTRÍA EN FARMACIA

“Búsqueda de los compuestos bio-activos en la especie
Prosthechea livida con propiedades antidiabéticas y
antihipertensivas”

PRESENTA

L.B. Marlen Miuler Mulero Navarrete

CODIRECTOR

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

CODIRECTOR

Dra. Angélica Flores Flores



Cuernavaca, Morelos, 2022

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Marlen Miuler Mulero Navarrete

Título de la tesis: “Búsqueda de los compuestos bio-activos en la especie *Prosthechea livida* con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas”.

Grado para obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza Observaciones (solo en caso de rechazo):

07 de marzo 2022

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2022-03-08 18:03:36 | Firmante

LOqDY2QCG2j2XAr/X0peDLZXt2UuDsy1X4nUeZ0QAp8ITWSi3P3OHHvxxojh6gAFAOLmPEeXy9F8ft4Ez+QixefE7xFsE4FflhZvcCmqwZnTcxE2Vc1g0MIYcZkboBNTIUVIZiC
eR1+u0LrMkgFPJC11Pe3jqQvhogmHvLEmr+NsdMz1ZC2sbg63laFEh0D7X/6UM7R4eQ2Z6xScpsUX+sD/HMY2RtZmR3HsJV7arPvqaiCacut0zfYRoJm3K87FWQDo79L8wAOz
D/plGxft0XzIfRI+4vPZGhF1Y4qyUXX6cjmTiRXcl6ksBFcYIzfkQEn92PVh9/8g+Aww8hA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



BMQqaSD31

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/roGDzfoHFOFZ2HXZLQLusXo8uUdlyA4T>



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Marlen Miuler Mulero Navarrete

Título de la tesis: “Búsqueda de los compuestos bio-activos en la especie *Prosthechea livida* con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas”

Grado para obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza Observaciones (solo en caso de rechazo):

18 de febrero 2022

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2022-02-18 14:44:41 | Firmante

GfHQ8B6RbJIVcW3xwc8SIfemdsBHacwYIObjeteMOqBcz747/WPd6oDyFyO5XpVTVKn2dvScvKuj9CibPvrEWyz0sMeOaNMXkh12YpH5BYr0gm7XTAKmKQjd0CdsDcDxN2/ZvU5O6ZlXoEohdpdVSoxzzeYHP9yN/GOVUgZH/FO9na8aBw2tnzfFyrtyeAOV7V4cEWDKzE4UQ0eVh+whuDYHG17QZlflnxEm8TlaWCxFPuYokZr2et8HE8ydkLbY8U7Xk+CXLXS2/06hS7p4VPpjeAyYUjaPhE9okSaZV1+vGOLiTGozxes0lTcYnuriTcOjNOwlcKWqub9lQUQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[aeOcwzfRX](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9BBACn2ubtqDp94QKWAbhGrJXA2bKo96>



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Marlen Miuler Mulero Navarrete

Título de la tesis: “Búsqueda de los compuestos bio-activos en la especie *Prosthechea livida* con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas”.

Grado para obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

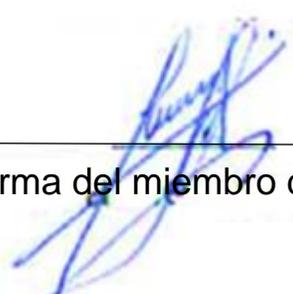
Miembro del jurado: Dr. Jaime Escalante García

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

05 de marzo 2022

Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Marlen Miuler Mulero Navarrete

Título de la tesis: “Búsqueda de los compuestos bio-activos en la especie *Prosthechea livida* con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas”

Grado para obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Priscila Sinaí Rendón Vallejo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

20 de febrero 2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PRISCILA SINAI RENDON VALLEJO | Fecha:2022-02-20 08:53:54 | Firmante

nAaiBAR/PIKRiczmoIKWniepekIIAXat2my+ng2eqnOBlyeX0SbPijrRmzSO16vyXV0dWOnAgAX1CrQaHUpR2nbJfcjocwR+WPyzPCvBpDeTWmjx9sZKIOkGez0kQrt41tw6Se8Mu5nMSF+4AOL+kqH5XbBjBzRzf699/HAERloypYndr5u/Z6jApfbCe8u4AX8IWLpUVte0tQGulvjF2YRq8BszK8K+7O2jqUdC+x9N+9lAnJsJ3j7+9WJykR7tAZLIXJxov44Hjeoztt3pBFQollru5G0e56/0cboRO+zeNm3CLvJENCZ2IS6pPlgOwx6GhcemNjUM/7PyM7WA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jFBRmZxys](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZijSA77Y7NYJXKTSggKtsftVUGqR8eNH>



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Marlen Miuler Mulero Navarrete

Título de la tesis: “Búsqueda de los compuestos bio-activos en la especie *Prosthechea livida* con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas”.

Grado para obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Flores Flores

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

05 de marzo 2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA FLORES FLORES | Fecha:2022-03-07 09:18:53 | Firmante

EnrDHY11Mx+z7Cn9abZtUFwO5Mo3M+GldWIR+oZIDjjcpGiu9vuvWuEV26iL4Kat95zOom1Dg7m4GxO6mnFMEv9z7JRcKSj7vRFX5d8tO651G5efjwlnwJJzj3haiOPaX76Tifz/O/S0yFaHt4BgQro+y91bUixkWinjrt9Sazbj5SmwEqcDyXqjqnXhpB+2ToyTgFxz+T6iUPI2nwkn6WILSyPFqcqixitcj3+t4+QTMPXoLBA6BLnwiozneqjhCGB0k9EL1DVcSajeF64pbQmTnp9fTEdUxuk6opqDYKa0uin/GzNkKwbUKNtUxa8BIPyJ9ZT6Uwx6Y1ym/N4g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[gWCdcfwjp](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hkisiaUD1bhtHGsgzJbXG6KWA3sErtD>



RESUMEN

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que es caracterizada por el aumento de glucosa en la sangre, tiene diversas complicaciones, las cuales se clasifican en micro y macrovasculares como el desarrollo de hipertensión arterial, la cual es una enfermedad crónica-degenerativa, en donde los vasos sanguíneos presentan una alteración en la tensión y mantienen la presión arterial elevada. El tratamiento de estas enfermedades se basa en una estrategia no farmacológica que consiste llevar una dieta adecuada y realizar actividad física, en conjunto con un tratamiento farmacológico que permitirá mantener los niveles plasmáticos de glucosa en niveles basales, así como el control de la presión arterial (en caso de necesitarse). Hoy en día existe todavía un porcentaje muy alto de la población que recurre al uso de la medicina tradicional de manera complementaria al tratamiento alopático, especialmente recurriendo a plantas medicinales que han sido utilizadas por el hombre como uno de los recursos más valiosos en su historia para tratar los diferentes padecimientos de salud. Con base en lo anterior, las plantas medicinales representan una fuente importante en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades. En este sentido, el uso etnomédico que se les atribuye a las orquídeas y a las diferentes especies del género *Prosthechea* sugiere la evaluación de la especie *Prosthechea livida* para determinar la actividad antidiabética y antihipertensiva y establecer su seguridad en modelos toxicológicos. Su estudio permitió establecer que el extracto DMBPL muestra un efecto antihiper glucémico significativo a las 0.5, 1, 2 y 3 horas en comparación con el control en la curva de tolerancia a la glucosa, mientras que en la curva de tolerancia a la sacarosa presenta un efecto antihiper glucémico significativo durante los tiempos establecidos en comparación con el control, además mostró un efecto vasorrelajante significativo independiente de la presencia de endotelio. En los estudios toxicológicos no presentó mortalidad de los individuos en las diferentes dosis ensayadas (5, 25, 50, 300 y 2000 mg/kg), y en los estudios de toxicidad subcrónica, los individuos utilizados no mostraron una diferencia en los pesos durante los 28 días de administración, sin embargo, presenta niveles altos de ALT y AST.

ABSTRACT

Diabetes is a chronic-degenerative disease that is characterized by increased blood glucose, which can lead to different vascular complications that are classified as microvascular, as well as macrovascular, such as the development of arterial hypertension that is a chronic-degenerative disease where the blood vessels present an alteration in tension and maintain high blood pressure. The treatment for these diseases consists of a non-pharmacological that establishes a diet and physical activity, together with pharmacological with several drugs with different mechanism of action. Also, it is well known that the use of traditional medicine is the most important alternative for the population in treatment of several diseases, being the medicinal plants the most important ones. Based on this, medicinal plants have been an important source in the search and development of new drugs for the treatment of several diseases. In this context, the ethnomedical uses attributed to orchids and the different species of the genus *Prosthechea* suggest the evaluation of the species *Prosthechea livida* to determine its antidiabetic and antihypertensive activities and to establish its safety in toxicological models. Thus, the dichloromethane:methanol (1:1) extract (DMBPL) showed a significant antihyperglycemic effect at 0.5, 1, 2 and 3 h. after treatment compared to the control in the glucose tolerance test and presented a significant antihyperglycemic effect at 0.5 and 1 hour compared to the control in the sucrose tolerance curve. On the other hand, extract showed a significant vasorelaxant effect in an endothelium independent manner. In the toxicological studies, there was no mortality of the individuals at the different doses (5, 25, 50, 300 and 2000 mg/kg), and in the subacute toxicity study for 28 days of administration, the animals treated did not showed a difference in body weight compared to control groups, neither alters ALT and AST levels.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia por facilitar el uso de sus instalaciones, así como la formación de estudiantes con gran profesionalismo y potencial para desarrollarse en el área de investigación y en diversos ámbitos de la salud.

A CONACYT por la beca otorgada (No. 765705) y el proyecto financiado (A1-S-13540) para la realización de la tesis de maestría, y por el impulso al desarrollo de profesionales en la ciencia y tecnología.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por facilitar el uso de sus instalaciones durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por la dirección y la concepción ideológica del proyecto de tesis, por aceptarme como alumna y permitirme ser parte de su grupo de trabajo, gracias por el apoyo brindado, por cada observación a lo largo de mi formación académica y cada una de las enseñanzas.

A la Dra. Angelica Flores Flores del INER, responsable de la codirección del presente proyecto de tesis, por cada uno de los conocimientos que me transmitió, por el apoyo, la paciencia y la confianza que me brindó para el desarrollo del proyecto.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Irene Perea Arango del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), al Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por sus inmejorables cuestionamientos, evaluaciones y participación en la presente investigación.

A mis compañeros del laboratorio 10, Gaona, Hugo y Luis, por su apoyo y a mis demás compañeros de laboratorio.

A mi familia por estar siempre a mi lado y por el apoyo que me han brindado.

ABREVIACIONES

ALT: Transaminasas

AST: Aspartato Transaminasa

ATP: Adenosín trifosfato o trifosfato de adenosina

CaCl₂: Cloruro de calcio

Ce(SO₄)₂: Sulfato cérico

CE₅₀: Concentración efectiva media

cGMP: Guanilato ciclasa

CTG: Curva tolerancia a la glucosa

CTS: Curva tolerancia a la sacarosa

DL₅₀: Dosis letal media

DT1: Diabetes Tipo 1

DT2: Diabetes tipo 2

EDMBPL: Extracto diclorometano/metanol bulbo de *Prosthechea livida*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FC: Frecuencia cardiaca

FeCl₃: Cloruro ferroso

IP3K: Vía de señalización de la fosfatidilinositol- 3-kinasa

IRS: Receptor de insulina

KCl: Cloruro de Potasio

N: Nicotinamida

NA: Noradrenalina

PA: Presión arterial

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

Contenido

RESUMEN	2
ABSTRACT:	3
AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIACIONES	5
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1 Diagnóstico de Diabetes	20
2.2 Tratamiento de la diabetes	21
2.3 Complicaciones asociadas a la diabetes	21
2.4 Hipertensión arterial	22
2.5 Tratamiento de la hipertensión arterial	23
2.6 Uso de las plantas en la medicina tradicional	24
2.7 Antecedentes de la familia <i>Orchidaceae</i>	24
2.8 Antecedentes del estudio fitoquímico de las orquídeas	25
2.9 Orquídeas del género <i>Prosthechea</i>	26
2.10 Antecedentes del estudio fitoquímico del género <i>Prosthechea</i>	26
2.11 Principales características de la especie vegetal <i>Prosthechea livida</i>	30
2.12 Antecedentes del estudio de la actividad biológica de <i>Prosthechea livida</i>	30
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 OBJETIVO GENERAL	33
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	33
6. METODOLOGÍA:	34
6.1 Obtención del material vegetal	34
6.2 Obtención de los extractos diclorometano: metanólico (1:1) de la especie <i>Prosthechea livida</i>	34
6.3 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios de EDMBPL	34
6.3.1 Prueba de sulfato cérico $Ce(SO_4)_2$ para la determinación de la presencia de alcoholes y polialcoholes	34

6.3.2 Prueba de cloruro férrico FeCl ₃ para la determinación de compuestos fenólico y taninos	35
6.3.3 Prueba de Dragendorff para el análisis de compuestos alcaloides	35
6.3.4 Prueba de Liebermann- Burchard para la identificación de esteroides y triterpenos	35
6.4 Separación y purificación de compuestos de <i>Prosthechea livida</i>	36
6.5 Evaluación farmacológica	36
6.5.1 Animales	36
6.5.2 Determinación de la actividad antihiperглиcémica en un modelo <i>in vivo</i>	37
6.5.2.1 Curva de tolerancia a la glucosa	37
6.6 Determinación de la actividad antidiabética en un modelo <i>in vivo</i>	38
6.6.3.1 Inducción de diabetes no insulino dependiente experimental	38
6.5.3.2 Evaluación aguda del efecto antidiabético	39
6.6 Efecto vasorrelajante de <i>P. lívida</i>	39
6.6.1 Determinación del mecanismo de acción del EDMBPL de <i>Prosthechea livida</i>	41
6.6.2 Exploración del efecto vasorrelajante sobre los receptores Alpha - adrenérgicos	41
6.6.3 Evaluación del mecanismo de acción por bloqueo de Canales de Calcio	42
6.6.4 Contracción inducida por calcio extracelular KCl 80 mM	42
6.6.5 Determinación del efecto antihipertensivo	43
6.6.6 Determinación de la toxicidad aguda	44
6.6.7 Determinación de la toxicidad subaguda	44
6.7 Tinción de los cortes histológicos	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1 Obtención del extracto diclorometano: metanol (1:1) de pseudobulbo <i>Prosthechea livida</i> (EDMBPL)	46
7.3 Determinación del efecto antihiperглиcémico	46
7.3.1 Evaluación aguda del efecto antidiabético	48
7.4 Evaluación de la actividad vasorrelajante	49
7.5 Mecanismo de acción del efecto vasorrelajante	52
7.5.1 Determinación del efecto vasorrelajante sobre los receptores Alpha- adrenérgicos	52

7.5.2 Exploración vasorrelajante sobre canales de calcio con contracciones acumulativas de CaCl₂	53
7.5.3 Contracción inducida por calcio extracelular KCl 80 mM	54
7.5.4 Determinación de la actividad antihipertensiva	55
7.6 Fraccionamiento primario biodirigido del EDMBPL	57
7.6.1 Determinación del efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas del EDMBPL	58
7.2 Caracterización cualitativa de metabolitos secundarios de EDMBPL	59
7.2.1 Revelado de placas cromatográficas con Sulfato cérico	59
7.2.2 Prueba colorimétrica de Liebermann- Burchard para la determinación de metabolitos secundarios	60
7.2.3 Prueba con reactivo Dragendorff para determinar la presencia de alcaloides en el EDMBPL	61
7.2.3 Revelado con Cloruro férrico (FeCl₃) para la determinación de compuestos fenólicos y taninos.	61
7.7 Caracterización de los compuestos aislados	62
7.8 Determinación de la actividad vasorrelajante de los compuestos obtenidos	62
7.9 Evaluación de la toxicidad aguda para determinar la DL₅₀	63
7.10 Evaluación de la toxicidad subaguda	65
7.11 Cortes histológicos	67
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	71
10. REFERENCIAS	72
11. ANEXOS:	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de secreción de insulina, en las células β del páncreas (Modificado de Oliva, 2003).....	19
Figura 2 Vía del fosfatidilinositol 3 quinasa, para la translocación del Glut4 y la captación de glucosa (Modificado de Reyes y Plancarte, 2008).	20
Figura 3 Cromatografía en columna abierta utilizada para la separación de los metabolitos secundarios del EDMBPL	36
Figura 4 Curva tolerancia a la glucosa en donde se administra vía oral los diferentes tratamientos, y posteriormente se obtiene muestra de sangre por punción en la vena caudal en los diferentes tiempos (https://mindthegraph.com/).	38
Figura 5 Extracción de la aorta de rata, realizando una disección abdominal y posteriormente limpiándola de tejido conectivo y cortada en segmentos (https://mindthegraph.com/).....	40
Figura 6 Evaluación del efecto vasorrelajante, comenzando con la estabilización del tejido, posteriormente sensibilizando con 3 contracciones de NA seguidas de un lavado y una cuarta contracción para la evaluación de los extractos (Figura propia).	40
Figura 7 Determinación del mecanismo de acción por curvas acumulativas de Na, en aorta aislada de rata en ausencia de endotelio (Figura propia).....	41
Figura 8 Determinación del mecanismo de acción por curvas acumulativas de CaCl_2 , en aorta aislada de rata en ausencia de endotelio (Figura propia)	42
Figura 9 Determinación del mecanismo de acción inducido por calcio extracelular por KCl 80 mM, en aorta aislada de rata en ausencia de endotelio (Figura propia)	43
Figura 10 Esquema de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, donde se obtuvieron 8 fracciones y 2 compuestos.....	58
Figura 11 Revelado de Placa cromatográfica del EDMBPL con una polaridad 95% diclorometano y 5% metanol, observado con luz ultravioleta a 365nm y revelada con sulfato cérico.	60
Figura 12 Prueba de Liebermann- Burchard, para determinar la presencia de compuestos fenólicos y taninos, en donde se observa que el EDMBPL al añadirle el	

reactivo cambia a un color verde oscuro, indicando la presencia de estos compuesto..... 60

Figura 13 Revelado de Placa cromatográfica del EDMBPL con una polaridad 97% diclorometano y 3% metanol, observado con luz ultravioleta a 254nm y 365nm, posteriormente revelada con el reactivo Dragendorff..... 61

Figura 14 Revelado con FeCl_3 en donde se observa en (1) el FeCl_3 disuelto con metanol al 100%, en el (3) se observa el EDMBPL disuelto en diclorometano metanol al 100%, y en el (2) se observa la reacción del EDMBPL al añadir el FeCl_3 , en donde se torna de color verde intenso indicando la presencia de compuestos fenólico y taninos..... 62

Figura 15 Cortes histológicos de los diferentes órganos aislados corazón, en donde se pueden observar las fibras musculares (A) que lo conforman, el riñón se puede observar un glomérulo (c), en el pulmón se observan los alveolos (D) y los septos alveolares (E)) se observa inflamación en la arteria hepática así como la pérdida de linfocitos cercanos a la vena porta (F), células binucleares (G) debido a la regeneración activa por una replicación celular, hepatocitos con núcleos grandes (H), necrosis activa mínima..... 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Fármacos para el tratamiento de diabetes tipo 2 y las nuevas terapéuticas (Ayala, Col. 2002).....	21
Tabla 2 Categorías de los niveles de presión arterial, sistólica y diastólica (Mancía Col, 2013).....	23
Tabla 3 Fármacos utilizados en la terapia clásica de hipertensión arterial (Rubio-Guerra 2018).....	23
Tabla 4 Diseño experimental para la determinación del efecto antihiperoglucémico	37
Tabla 5 Evaluación aguda en ratones diabéticos, diferentes tratamientos y horas de medición de niveles de glucosa.....	39
Tabla 6 Evaluación del efecto antihipertensivo en ratas SHR, espontáneamente hipertensas.....	43
Tabla 7 Determinación del peso y de los rendimientos del extractos diclorometano/metanol de bulbo de Prosthechea livida.	46
Tabla 8 Grupos del estudio de toxicidad aguda (n=5) por grupo.	64
Tabla 9 Clasificación de la toxicidad aguda de sustancias químicas de acuerdo con la guía GHS.....	64

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Curva de tolerancia a la glucosa del extracto diclorometano/metanol bulbo de <i>Prosthechea livida</i> (EMBPL) en donde * representa una diferencia significativa, en los diferentes tiempos, a 30 min, 1, 1.5, 2 y 3 horas con respecto al vehículo. 47	47
Gráfica 2 Curva de tolerancia a la sacarosa del extracto diclorometano/metanol bulbo de <i>Prosthechea livida</i> en donde * representa una diferencia significativa, en los diferentes tiempos, a 30 min 1, 1.5 y 2 horas con respecto al vehículo..... 48	48
Gráfica 3 Evaluación de la actividad antidiabética del EDMBPL en donde se observa una reducción de glucosa a los diferentes tiempos 1,3,5 y 7 horas. 49	49
Gráfica 4 Efecto vasorrelajante del extracto diclorometano/metanol bulbo de <i>Prosthechea livida</i> en presencia de endotelio (E+) y ausencia de endotelio (E-). Donde no se observa diferencia significativa en el porcentaje de relajación en presencia y ausencia de endotelio. 50	50
Gráfica 5 Efecto del extracto diclorometano/metanol de bulbo en la contracción inducida por NA (0.00001 μ M a 10 μ M) en anillos de aorta sin endotelio. 52	52
Gráfica 6 Efecto del extracto diclorometano/metanol bulbo de <i>Prosthechea livida</i> en la contracción inducida por CaCl ₂ en anillos de aorta sin endotelio..... 54	54
Gráfica 7 Curva de contracción con calcio extracelular, donde se observa un bloqueo de canales de calcio obteniendo un Emax de 81.07 \pm 2.18..... 55	55
Gráfica 8 Parámetros de Presión arterial sistólica en ratas SHR, con administración de EDMBPL, en donde no se observó ninguna diferencia significativa comparado con el control. 56	56
Gráfica 9 Parámetros de Presión arterial Diastólica en ratas SHR, con administración de EDMBPL, en donde no se observó ninguna diferencia significativa comparado con el control. 56	56
Gráfica 10 Determinación de la frecuencia cardiaca en ratas SHR, con administración de EDMBPL, en donde no se obtuvo diferencia significativa comparadas con el control. 57	57
Gráfica 11 Determinación de la actividad vasorrelajante en presencia y ausencia de endotelio, de las fracciones obtenidas en la columna cromatográfica..... 59	59

Gráfica 12 Evaluación del efecto vasorrelajante de los compuestos obtenidos de la columna cromatográfica.	63
Gráfica 13 Variación de pesos de los ratones en los 28 días de los diferentes tratamientos utilizados (sham, vehículo y extracto).	65
Gráfica 14 Niveles de transaminasa para determinar si existe un posible daño en el hígado.	66
Gráfica 15 Variación de pesos de los diferentes órganos aislados de ratones tratados con tres diferentes tratamientos sham (agua), tween 80 al 10% y EDMBPL.	67

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que actualmente la padecen 537 millones de adultos en todo el mundo, y se espera que para el año 2030 este número incremente a 643 millones de pacientes diabéticos (Atlas IDF, 2021). En México existen 14.1 millones de personas de entre 20 y 79 años que padecen esta enfermedad y 4.9 millones se encuentran sin ser diagnosticados, ocupando así el séptimo lugar a nivel mundial con mayor prevalencia, después de China, India, Pakistán, Estados Unidos, indonesia y Brasil; se espera que en el año 2045 este número incremente a 21.2 millones de personas (Atlas IDF, 2021).

Ésta es una enfermedad caracterizada por el aumento de las concentraciones de glucosa en la sangre además de tener signos y síntomas característicos como fatiga, polifagia, sed excesiva, poliuria, pérdida de peso sin razón aparente y aumento del apetito. Esta enfermedad se puede clasificar en cuatro tipos: Diabetes Tipo 1 (DT1) caracterizada por una deficiencia en la producción de insulina, Diabetes Tipo 2 (DT2) cuya principal característica es el desarrollo de una resistencia a la acción biológica de la insulina y adicionalmente no se produce suficiente insulina, diabetes gestacional que se puede presentar a partir del segundo trimestre del embarazo y otros tipos de diabetes, como la diabetes MODY (diabetes de la edad madura que se presenta en el joven) que tiene orígenes genéticos (Atlas IDF, 2019, American Diabetes Association, 2020).

Por otro lado, la DT2, se caracteriza por el desarrollo de diferentes complicaciones, especialmente de tipo microvasculares tales como el desarrollo de retinopatía diabética, nefropatía, neuropatía y enfermedades macrovasculares como la cardiopatía isquémica, enfermedades cerebrovasculares, estenosis de la arteria renal, arteriopatías periféricas, aterosclerosis, e hipertensión (Mitchel, y Chéry, 2013, Bravo, 2001).

Debido a lo anterior, se puede considerar que la diabetes y la hipertensión son enfermedades concomitantes, dado que se ha observado que en pacientes con diabetes tipo 2, la hipertensión puede estar presente al momento del diagnóstico o antes de desarrollarse, lo que da paso al desarrollo del síndrome metabólico, que además incluye la resistencia a la insulina y la obesidad (Valdés-Bencosme, 2009).

A causa de esto se puede desarrollar la enfermedad coronaria, siendo la causa del 86% de las muertes por diabetes relacionadas con el desarrollo de hipertensión y otras complicaciones macrovasculares, en donde el acumulamiento de ácidos grasos en los vasos sanguíneos disminuye el paso de la sangre, y esto puede dar como resultado el incremento de la presión arterial desarrollando así hipertensión (Araya, 2004).

En este sentido, la hipertensión es una enfermedad causada por factores conductuales que se relacionan con mantener una mala alimentación, inactividad física, consumo de tabaco, consumo excesivo de alcohol y factores metabólicos como diabetes, obesidad y dislipidemias, además de factores genéticos, y se estima que anualmente se diagnostican aproximadamente 450,000 nuevos casos de hipertensión en México (ENSANUT, 2019).

El tratamiento para ambas enfermedades consiste principalmente en cambiar los hábitos alimenticios siguiendo una dieta adecuada baja en azúcares, grasas y sal, incrementar el consumo de algunas frutas, verduras y fibra, acompañando la dieta con ejercicio físico (Iza Stoll, 2006).

Además de utilizar conjuntamente un amplio repertorio de fármacos, dentro de los cuales podemos encontrar a las biguanidas, sulfonilureas, secretagogos de acción de insulina, tiazolidinas e inhibidores de alfa glucosidasas para el tratamiento de la diabetes y fármacos de la familia de los beta bloqueadores IECA, ARA II, bloqueadores de canales de calcio, diuréticos para el tratamiento de hipertensión, y la combinación de fármacos es común para tratar ambas fisiopatologías (Iza Stoll, 2006, del Olmo, Col., 2008).

No obstante, muchos de los pacientes con estas enfermedades recurren a la medicina tradicional como una alternativa para complementar el tratamiento farmacológico y no farmacológico, utilizando las plantas medicinales por su conocimiento en su uso desde la antigüedad para tratar diferentes padecimientos debido a los principios activos con propiedades farmacológicas que presentan en sus diferentes órganos (Legorreta, 1997).

Dentro de las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional se pueden encontrar a las orquídeas, las cuales son una familia importante en la medicina tradicional con una gran variedad de propiedades terapéuticas como hipoglucemiantes, para tratar padecimientos renales y para prevención y tratamiento de cáncer, tos y quemaduras, entre otros. En recientes años muchos estudios científicos han confirmado las propiedades farmacológicas que presentan como antidiabético, vasorrelajante, antibacteriano y antioxidante. En el género *Prosthechea*, se han demostrado diferentes actividades biológicas tales como hipoglucemiante, antioxidante, antibacteriana, cicatrizante, citotóxica, vasorrelajante y antihiperlipidémica (Gutiérrez, 2010).

Debido a los antecedentes encontrados en la familia Orchidaceae y los usos etnomédicos que se le atribuye a la especie *Prosthechea livida*, y a la falta de estudios que presenta esta especie, en este proyecto se decidió determinar la actividad antidiabética y antihipertensiva de la especie *Prosthechea livida*, y aislar algunos de los compuestos responsables de ambas actividades, y así mismo demostrar seguridad farmacológica en modelos toxicológicos.

2. ANTECEDENTES

La diabetes es una enfermedad crónico- degenerativa, la cual es caracterizada por el aumento de glucosa en la sangre, debido a que la hormona (insulina), encargada de regular la glucosa en sangre no actúa de manera adecuada en el organismo o no se produce en suficiente cantidad (Malgor y Valencia 2000). La insulina es un péptido de 51 aminoácidos secretada hacia la sangre por medio de las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans, como respuesta a niveles elevados de glucosa, su producción comienza en el ribosoma, sintetizando pre-proinsulina que se sintetiza como cadena polipeptídica en el retículo endoplásmico rugoso, donde se transforma en proinsulina formada por una cadena A, B y C, la cual es transportada al aparato de golgi en vesículas donde se extiende formando insulina y péptido C (Garrido y Torres, 2008, Torres-Luna, 2013).

La secreción de insulina (**Figura 1**) se da debido a que después de que los alimentos son ingeridos, hay un aumento de glucosa en el organismo, lo cual ocasiona la despolarización de las células β , y de esta manera permitir el paso de glucosa a la célula mediante el transportador Glut-2, donde el carbohidrato es fosforilado en glucosa 6- fosfato por la enzima glucocinasa, cerrando los canales de potasio (K^+) sensibles a ATP, esto ocasiona la despolarización de la membrana y estimula los canales de calcio (Ca^{2+}), lo que promueve la fusión de la vesícula que contiene la insulina con la membrana plasmática y así liberar la insulina al torrente sanguíneo (Cervantes-Villagrana, y Presno-Bernal, 2013).

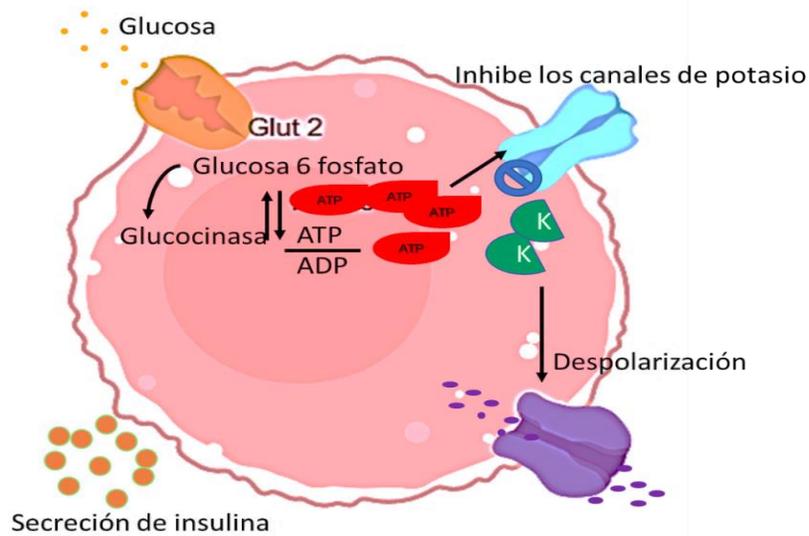


Figura 1 Mecanismo de secreción de insulina, en las células β del páncreas (Modificado de Oliva, 2003).

El receptor de insulina posee actividad tirosina-quinasa, está formado por cuatro subunidades: dos α y dos β . La insulina es reconocida por las subunidades α , generando un cambio de formación en la estructura que forma la función cinasa de sus subunidades β produciendo una autofosforilación cruzada de las subunidades en sus residuos de tirosina, siendo reconocidas por el sustrato del receptor de insulina (IRS) la cual sufre fosforilación en sus residuos de tirosina (Anaya-Ariza 2005)

Una de las vías más importantes es la vía IP3K: fosfatidilinositol 3 quinasa (**Figura 2**), en donde el sustrato del receptor de insulina IRS es reconocido por IP3K y fosforila al fosfatidilinositol 4,5-difosfato, convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato el cual sirve de anclaje a la proteína cinasa dependiente de fosfatidilinositol (PDK1) que a su vez fosforila a la proteína cinasa B (PKB), eventualmente activándose y desprendiéndose de la membrana, entonces PKB, activa enzimas como fosfatasas, fosfodiesterasas, también puede fosforilar factores para la transcripción de genes que codifican enzimas y proteínas, además de activar el transportador Glut-4 haciendo que este se transloque en la membrana y de esta manera permitiendo el paso de glucosa a las células (Bastarrachea, Col., 2005, Zanoguera, 2012, Chen, col., 2014).

Sin embargo, cuando se padece diabetes la insulina no puede ser reconocida por su receptor, ocasionando que este proceso de la vía IP3K no se lleve a cabo y por lo tanto no pueda realizarse una captación de glucosa, ocasionando que permanezca en la sangre, aumentando de esta manera las concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo, incrementando su nivel por encima de los valores normales y provocando que las células no tengan suficiente energía para poder funcionar adecuadamente, en este momento el cuerpo recurre a la utilización de la grasa como fuente de energía, produciendo cuerpos cetónicos (Mendoza, col. 2005).

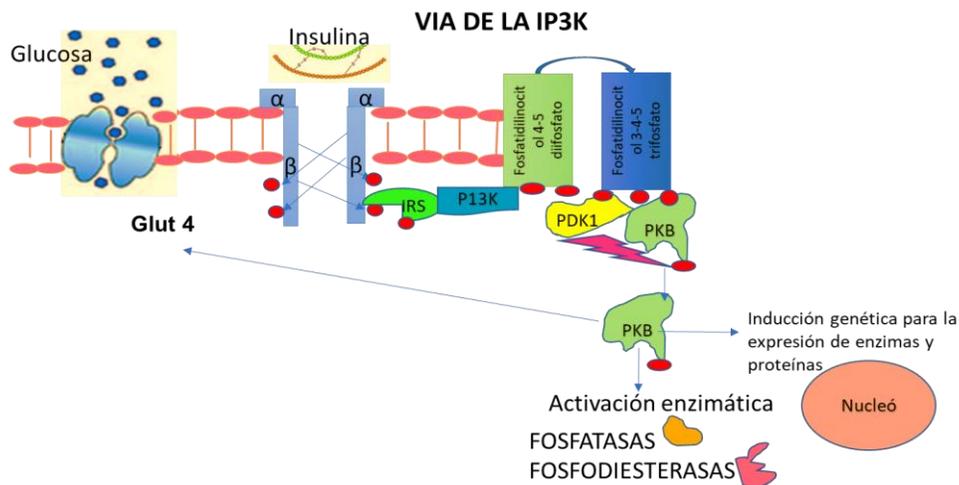


Figura 2 Vía del fosfatidilinositol 3 quinasa, para la translocación del Glut4 y la captación de glucosa (Modificado de Reyes y Plancarte, 2008).

2.1 Diagnóstico de Diabetes

El diagnóstico de diabetes, se basa en los criterios bioquímicos de glucosa, los cuales son los siguientes, glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl, con un ayuno de al menos 8 horas, glucemia ≥ 200 mg/dl a las 2 horas de una sobrecarga oral de glucosa, y hemoglobina glucosilada (HbA1c mayor o igual de 6,5 %), además de la presencia de síntomas frecuentes en la diabetes, sed excesiva, fatiga, visión borrosa, pérdida de peso, aumento del apetito, curación lenta e infecciones frecuentes, hormigueo o entumecimiento en las manos o los pies, una vez que se ha determinado el padecimiento de DT2 es importante llevar un tratamiento adecuado para mantener los niveles de glucosa adecuados (Gil-Velázquez, Col. 2013).

2.2 Tratamiento de la diabetes

El tratamiento de la diabetes se clasifica en no farmacológico, el cual consiste en realizar actividad física y mantener una dieta saludable conjunto con un tratamiento farmacológico, que consiste en biguanidas, sulfonilureas, tiazolidinediona e inhibidores alfa glucosidasas (Ayala, Col. 2002). Los medicamentos antidiabéticos que se usan para la diabetes tipo 2 tiene diversos mecanismos (**Tabla 1**), como por ejemplo para aumentan la secreción de insulina, aumentar la sensibilidad a la insulina, aumentar la absorción de glucosa en el músculo y disminuir la absorción de glucosa (Gómez Col., 2013).

Tabla 1 Fármacos para el tratamiento de diabetes tipo 2 y las nuevas terapéuticas (Ayala, Col. 2002).

Fármacos para el tratamiento de la DT 2			
Terapia Clásica		Dianas novedosas	
Sulfonilureas	Glibenclamida	Agonistas GPR 40	TAK-875
Tiazolidinediona	Pioglitazona		
Biguanidas	Metformina		
Meglitinidas	Repaglinida		
inhibidores α -glucosidasas	Acarbosa	Agonistas AdipoR ₁ y R ₂	AdipoRon
Inhibidores dipeptidil peptidasa 4	Sitagliptina		
Análogos de incretinas	Exenatida	Inhibidores PTP	Moléculas experimentales
Inhibidores transportador sodio-glucosa	Dapaglifosina		

2.3 Complicaciones asociadas a la diabetes

La diabetes puede llevar consigo diferentes complicaciones, las cuales se clasifican en microvasculares: como neuropatía diabética, retinopatía y nefropatía; así como en macrovasculares: como enfermedad cerebrovascular, enfermedad de las arterias coronarias, y enfermedad de arterias periféricas. Alrededor del 45% de las personas con diabetes sufren alguna complicación microvascular, de mismo modo las personas con diabetes corren cuatro veces más riesgo de desarrollar alguna enfermedad cardiovascular periférica (Bravo 2001, Chawla, 2013).

La hipertensión arterial es una comorbilidad considerablemente frecuente en los pacientes diabéticos, debido a que afecta entre el 20-60% de la población con diabetes mellitus, la prevalencia de hipertensión en diabéticos es 1,5-3 veces superior que en personas no diabéticas además de que la hipertensión contribuye en el desarrollo y la progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes. (Araya, 2004).

2.4 Hipertensión arterial

La OMS define la hipertensión arterial como una enfermedad crónica-degenerativa, en la cual los vasos sanguíneos presentan una alteración en la tensión y mantienen la presión arterial elevada, lo que puede llegar a dañarlos (Organización mundial de la salud 2021). La presión arterial (PA) se define como la fuerza hidrostática de la sangre sobre las paredes arteriales, que resulta de la función de bombeo del corazón, volumen sanguíneo, resistencia de las arterias al flujo, y diámetro arterial (NOM-030-SSA2-1999).

Actualmente se estima que anualmente se diagnostican aproximadamente 450,000 nuevos casos de hipertensión en México, esta enfermedad ha estado aumentando con el tiempo debido a los cambios que se han dado en los estilos de vida. La hipertensión es una enfermedad causada por diferentes factores como malos hábitos alimenticios, inactivación física, consumir tabaco, consumo excesivo de alcohol y factores metabólicos como diabetes, obesidad y dislipidemias, además de factores genéticos (ENSANUT, 2019).

La presión arterial se mide por medio del ciclo cardiaco, el cual está formado por un periodo de relajación (diástole) este se da cada que el corazón se relaja y se llena de sangre, y un periodo de contracción (sístole), cada que el corazón se contrae y envía sangre al cuerpo, en donde los niveles normales de presión arterial son 120/80 mmHg, se considera hipertensión arterial cuando se mantiene una presión igual o mayor de 140/90 mmHg, **tabla 2** (Hall, 2015, Williams Col., 2019).

Tabla 2 Categorías de los niveles de presión arterial, sistólica y diastólica (Mancía Col, 2013).

Categoría	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Optima	< 120	<80
Normal	120-129	80-84
Normal alta	130-139	85-89
HTA de grado 1	140-159	90-99
HTA de grado 2	160-170	100-109
HTA de grado 3	≥180	≥110
HTA sistólica aislada	≥140	<90

2.5 Tratamiento de la hipertensión arterial

El tratamiento de la hipertensión consiste en un tratamiento no farmacológico que establece llevar una dieta saludable baja en sodio y grasas trans, además de disminuir/evitar el consumo cafeína, tabaco, disminuir la ingesta de alcohol, realizar actividad física, juntamente con el tratamiento farmacológico en el cual se utilizan diuréticos de tiazida, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores del receptor de la angiotensina II, bloqueadores de canales de calcio **tabla 3** (Bragulat, 2001).

Tabla 3 Fármacos utilizados en la terapia clásica de hipertensión arterial (Rubio-Guerra 2018).

Fármacos para el tratamiento de hipertensión arterial	
Terapia Clásica	
Diuréticos tiazídicos	Clortalidona
Diuréticos de asa	Furosemida
Bloqueadores de receptores de aldosterona	Espironolactona
Beta-Bloqueadores	Metopropanol
IECA	Captopril
ARAI	Candesartán
Bloqueadores de Calcio	Nifedipina
Alfa-1 Bloqueadores	Prazosina

2.6 Uso de las plantas en la medicina tradicional

Una de las alternativas a las que recurren las personas con diabetes e hipertensión para complementar el tratamiento farmacológico es el uso de la medicina tradicional, la cual ha existido desde el desarrollo de civilizaciones antiguas, basándose en el uso de plantas medicinales, en México el 80% de las personas acuden a la medicina tradicional como alternativa, sin embargo, esto implica un riesgo para la salud, debido a que solo una pequeña parte de la población de plantas medicinales ha sido estudiada, por lo tanto, se desconocen los efectos farmacológicos, fitoquímico y toxicológicos de la mayoría de las especies, tan solo en México se estima que existen 24,400 plantas vasculares, de las cuales 3,000 poseen efectos farmacológicos (Bissell, 2015, Zhang, 2018, CONABIO, 2018).

Una planta medicinal, se define como toda especie vegetal que contiene sustancias las cuales pueden ser utilizadas para propósitos terapéuticos, debido a que poseen principios activos con actividad biológica, ya sea beneficiosa o perjudicial para el ser humano, debido a los metabolitos secundarios que presentan, los cuales pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estos metabolitos no presentan función en el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, tienen una función ecológica en su organismo, ya que se encargan de protegerlos en contra de las diversas adversidades del medio ambiente, tales como depredadores o microorganismos patógenos (Taiz y Zeiger, 2006, Latha col., 2007).

2.7 Antecedentes de la familia *Orchidaceae*

Una de las familias estudiadas con fines farmacológicos es la familia *Orchidaceae*, la cual es una familia muy diversa con aproximadamente 25,000 a 35,000 especies, en todo el mundo, México posee 1260 especies de orquídeas, se distribuyen en regiones tropicales, bosques de niebla, en donde se caracterizan principalmente por sus flores llamativas las cuales presentan tres sépalos y tres pétalos, un labelo en medio, algunas especies presentan pseudobulbo y rizoma. Dentro de sus principales usos son: plantas ornamentales y/o con fines medicinales, para tratar tumores, heridas, tos, entre otros (Freuler, 2008, Didier-Cox, 2013).

2.8 Antecedentes del estudio fitoquímico de las orquídeas

Los estudios fitoquímicos en orquídeas se hicieron a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX y en la década de los 60", se aislaron alcaloides del tipo dendrobina a partir de *Dendrobium nobile* lo cual incitó al estudio de diferentes especies de orquídeas (Estrada Soto, 2000).

Se han aislado metabolitos secundarios de estas especies, entre los cuales se pueden encontrar compuestos de tipo: alcaloides (picrotoxano, pirrolizidínicos y fenilalquilaminas), triterpenos del grupo cicloartano y lanostano, esteroides, cumarinas, flavonoides, compuestos aromáticos, estilbenos, entre otros (Redón, 2011).

Por otro lado, dentro de la familia Orchidaceae existen diversos géneros que han sido estudiados para establecer diferentes efectos farmacológicos como potenciales agentes antioxidante, antiinflamatorio, antidiabéticos y antihipertensivos, dentro de ellos se destacan los géneros *Laelia*, *Occidium*, *Epidendrum*, *Prosthechea*, destacándose como compuestos bioactivos derivados de estilbenos, triterpenos y fenantrenos (Vergara-Galicia Col., 2013).

Los derivados de fenantreno son una clase de metabolitos aromáticos, que se forman por acoplamiento oxidativo de los anillos aromáticos de los precursores de estilbeno. Se han aislado dentro de la familia Orchidaceae, en los géneros *Bletilla*, *Bulbophyllum*, *Coelogyna*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Ephemerantha*, *Epidendrum*, *Eria* y *Maxillaria*. Además, se ha informado que un gran número de fenantrenos posee diversas actividades biológicas, tales como antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiplaquetaria, citotóxica, espasmolítica, vasorrelajante, como inhibidores de α -glucosidasas, entre otros (Estrada., col. 1999, Rendón., col. 2012).

Además, se ha demostrado que algunos fenantrenos y estilbenos han presentado propiedades relajantes del músculo liso, debido a que han mostrado actividad espasmolítica mediada por el sistema óxido nítrico / cGMP, además que se ha demostrado el bloqueo de los canales de calcio tipo L voltaje dependiente (Estrada., col. 1999, Rendón., col. 2012, Vergara-Galicia Col., 2013).

2.9 Orquídeas del género *Prosthechea*

El género *Prosthechea* posee aproximadamente 112 especies, se distribuye en Florida, México y América. En México, se encuentran cerca de 46 especies, las cuales se caracterizan por ser plantas epífitas, algunas veces presentan rizoma evidente, pseudobulbos formados por un entrenudo, hojas en el ápice del pseudobulbo, bráctea espectralécea evidente, sépalos y pétalos similares entre si (Cervantes- reyes, 2008).

En la medicina tradicional, algunas especies son utilizadas para tratar diabetes, tos, heridas, quemaduras, inflamación de riñón y como depurativo del sistema circulatorio, en donde se han derivado diferentes metabolitos secundarios, como flavonoides, fenoles, cumarinas, saponinas, triterpenos, y esteroides. En este género se han realizado estudios en distintas especies, dentro de los cuales se han encontrado diferentes actividades farmacológicas (Diaz Avilés, 2018).

2.10 Antecedentes del estudio fitoquímico del género *Prosthechea*

En el año 2008, Cervantes-Reyes y colaboradores evaluaron la actividad antiinflamatoria en ratones CD1, en donde se obtuvo que los extractos con efecto antiinflamatorio son el corofórmico de hoja, hexánicos de rizoma y pseudobulbo y metanólico de pseudobulbo, en donde se obtuvo un porcentaje positivo con un valor de inhibición de 0.65. Además, se evaluó la actividad cicatrizante en ratas wistar y los extractos que presentaron esta actividad son los clorofórmico de pseudobulbo y rizoma y el metanólico de pseudobulbo con un valor de Inhibición de 4.72 en la longitud de cicatrización. Por otro lado, se determinó el efecto hipoglucemiante en ratones CD1, en donde los ratones tratados con los extractos clorofórmicos de hoja y rizoma, además de los hexánicos y metanólicos de rizoma y acuoso de pseudobulbo, presentaron una disminución de los niveles de glucosa a las 2 y 4 horas después del tratamiento, con un valor de 16.88 de diferencia de la media de glucosa.

Martínez y Mares (2010), evaluaron el efecto antioxidante en extractos metanólicos de pseudobulbo de *Prosthechea michuacana*, determinándose propiedades antioxidantes, además se evaluó el efecto antibacteriano en distintas cepas de bacterias, sin embargo, solo se encontró efecto en la inhibición de *Klebsiella pneumoniae*, con 19 mm de inhibición a la concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Gutiérrez, (2010) realizó un estudio de los extractos de metanol, hexano y cloroformo de bulbos de *P. michuacana* en un modelo de lesión renal inducida por cisplatino en ratas, en donde el tratamiento con cisplatino indujo elevaciones en concentraciones de urea en sangre, creatinina sérica y en la peroxidación lipídica. Los tratamientos con el extracto metanólico aumentaron los niveles de marcadores bioquímicos de daño renal como glutatión reducido, glutatión S-transferasa y superóxido dismutasa e inhibió los aumentos en las concentraciones sanguíneas de urea y creatinina sérica y la peroxidación lipídica inducida por cisplatino, sin embargo, los extractos de hexano y cloroformo no mostraron ningún efecto. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que esta orquídea puede ser una fuente potencial de actividad neuro protectora.

Pérez-Gutiérrez y Hoyo-Vadillo, (2011) Evaluaron los efectos antidiabéticos, antihiperlipidémico y glicación, de extractos hexánico, cloroformo y metanol, de pseudobulbos de *Prosthechea michuacana* en ratas normoglucémicas y con diabetes inducida con estreptozotocina, en donde los niveles de glucosa sanguínea se determinaron por el método de GOD-POD, sin embargo, solo los extractos hexánicos mostraron efectos antidiabéticos significativos y en sus complicaciones con una dosis 200 y 400 mg/kg, ambas dosis redujeron los niveles de glucosa un 35.75 y 47.78% en las ratas diabéticas, y 50.64 y 57.10% en las ratas normoglucémicas.

Estas dosis disminuyeron la hiperlipidemia, reduciendo el colesterol en un 41.56% y 46.08%, respectivamente; y los triglicéridos en un 37.5% y 46.27%, en comparación con los fármacos glibenclamida y tolbutamida. El extracto hexánico disminuyó la hiperinsulinemia en un 24%, los extractos de *Prosthechea michuacana* mostraron un cambio significativo *in vitro* sobre la formación de los AGEs con valores de $EC_{50} = 48.3$ mg/ml comparable al efecto inhibitor de la aminoguanidina con valores de $IC_{50} = 27.2$ mg/ml, además en ratas con diabetes crónica se redujeron los niveles de HbA1C en un 6.4% (Pérez-Gutiérrez y Hoyo-Vadillo, 2011)

Pérez y Col. 2011, realizaron un estudio en donde evaluaron el efecto de los flavonoides aislados del extracto metanólico de *P. michuacana* en daño hepático en ratones inducido por tetracloruro de carbono, los efectos hepatoprotector se evaluaron midiendo algunas enzimas importantes como aspartato transaminasa, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina, glutamato, nivel de bilirrubina total, deshidrogenasa de lactato, proteína sérica y peroxidación lipídica. De este extracto se aislaron cuatro flavonoides (6-metil éter de scutellareína, dihidroquercetina, apigenina 7-O-glucósido y apigenin-7-neo hesperidósido y apigenin-6-O- β -D glucopiranosil-3-O- α -L rhamno *piranósido*), en donde el tratamiento con los flavonoides evitó los cambios bioquímicos en el hígado. Los compuestos más activos exhibieron un buen efecto hepatoprotector comparado con el fármaco hepatoprotector similina.

Perez-Gutierrez, en 2013, estudió los efecto hipoglucémicos e hipolipidémicos de dos nuevos triterpenos aislados del extracto hexánico de bulbos de *Prosthechea michuacana*, en un modelo de diabetes tipo 2 inducida por estreptozotocina-nicotinamida. El efecto de los triterpenos se estudió sobre diferentes parámetros bioquímicos que incluyen: nivel de glucosa, colesterol total, triglicéridos, peroxidación lipídica, glucógeno hepático y muscular, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, efecto sobre células RIN-5F del estrés oxidativo inducido por los AGE y niveles de TNF- α e IL-6 en suero.

También se analizó la función hepática determinando las actividades de glucosa-6-fosfatasa, glucoquinasa y hexoquinasa y el efecto sobre el nivel de insulina. Los dos triterpenos demostraron que en los ratones diabéticos hubo una disminución en la ingesta de alimentos, agua y pérdida de peso corporal, en niveles de glucosa en sangre, colesterol en suero, triglicéridos, lipoproteínas y aumentan el colesterol HDL, mejoran el nivel de sustancia reactiva TBARS y SOD, CAT, GSH y GPX. La administración de 20 mg/ kg exhibió un aumento significativo de insulina en suero y tejido de páncreas, además disminuyó la glucosa sérica y protegen las células β del páncreas del estrés oxidativo y aumentan la liberación de insulina de las células beta del páncreas en las células RIN-5F cultivadas. También disminuyó en suero el nivel de IL-6 y TNF- α . Por lo que estos triterpenos pueden disminuir la resistencia a la insulina al reducir el TNF- α en suero. Por lo tanto, a partir de estos triterpenos se puede llegar a desarrollar un profármaco anti-obesidad, para disminuir la resistencia a la insulina y anti-hiperglucemiante.

En 2017 Rojas y Col. realizaron un estudio en la especie *Prosthechea karwinskii* en donde determinaron el efecto en dislipidemias y obesidad en un modelo de ratas Wistar con síndrome metabólico, los diferentes extractos de esta planta disminuyeron los triglicéridos, colesterol, glucosa, grasa abdominal, y regulan el peso corporal de los animales tratados.

Por otro lado, Diaz-Avilés (2018), estableció el perfil fitoquímico de *P. livida* y *P. cochleata* encontrando que estas plantas presentan alcaloides, cumarinas volátiles, flavonoides, saponinas, triterpenos y/o esteroides, antracénicos libres, así mismo evaluó la actividad tóxica en larvas de *Artemia salina*, siendo los extractos hexánico y diclorometano/metanol de raíz, rizoma y pseudobulbo de *Prosthechea cochleata* los que mostraron una mayor toxicidad con respecto a los extractos de *Prosthechea livida*.

2.11 Principales características de la especie vegetal *Prosthechea livida*

Es una orquídea epífita, con pseudobulbo con forma elíptica, posee una o dos hojas apicales, florece durante todo el año, posee una inflorescencia apical de 4 a 11 cm, con 3 a 7 flores, se encuentra en bosques húmedos y estacionalmente secos, forma esteras en árboles, cactus y rocas, se distribuye en Chiapas, Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (CONABIO. 2009).

2.12 Antecedentes del estudio de la actividad biológica de *Prosthechea livida*

En estudios previos (Mulero, 2019), se estableció que *Prosthechea livida* muestra un efecto antihiper glucémico significativo en curvas de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa. Por otro lado, se estableció que los extractos derivados de esta especie tienen una actividad vasorrelajante significativa independiente de la presencia de endotelio y que su principal mecanismo de acción está relacionado con el bloqueo de canales de calcio (Gómez-Pineda, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han sido una fuente importante en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos experimentales para el tratamiento de enfermedades no transmisibles como la hipertensión y la diabetes. En este sentido, el uso etnomédico que se les atribuye a las orquídeas y a las diferentes especies del género *Prosthechea* para coadyuvar en estas enfermedades sugiere su interés en varias vertientes. Una de ellas es la evaluación de la especie *Prosthechea livida* para determinar, si presenta actividad antidiabética y antihipertensiva de acuerdo con los antecedentes que presenta, y establecer a esta especie como una fuente para la búsqueda de metabolitos bioactivos, ya que es importante descubrir moléculas novedosas o conocidas que puedan tener actividades duales y demostrar su seguridad farmacológica para su uso. Finalmente, en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento de estas enfermedades se pretende que presenten la menor cantidad de efectos adversos o bien sus propiedades farmacológicas sean más eficaces y potentes.

4. HIPÓTESIS

Prosthechea livida tendrá actividad antihipertensiva y antidiabética en modelos murinos y mostrará seguridad farmacológica en modelos toxicológicos, así mismo, contendrá compuestos con propiedades farmacológicas responsables de dichas actividades.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la actividad antidiabética y antihipertensiva de *Prosthechea lívida* y establecer su seguridad en modelos toxicológicos, así como aislar algunos de los compuestos responsables de la actividad.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar las actividades antihiper glucémica, antidiabética y antihipertensiva agudas del extracto diclorometano:metanólico (1:1) obtenido de pseudobulbos de *P. lívida* (EDMBPL).
- ❖ Determinar el mecanismo de acción del EDMBPL en un modelo vasorrelajante *ex vivo*.
- ❖ Evaluar la toxicidad aguda y subaguda del EDMBPL en ratones CD1
- ❖ Identificar los metabolitos secundarios de EDMBPL mediante técnicas colorimétricas y cromatográficas.
- ❖ Aislar y purificar algunos compuestos del EDMBPL que pudieran mostrar las actividades mencionadas.

6. METODOLOGÍA:

6.1 Obtención del material vegetal

La recolección del material vegetal fue realizada por el MBT. Oswaldo Javier Enciso Díaz en la Sierra de Otontepec en el Estado de Veracruz de Ignacio Llave en el 2019, registrado en el herbario de la Universidad Veracruzana con el número de baucher OE-009 (**Anexo 1**).

Una vez colectada la planta fue clasificada en las diferentes partes (hoja y pseudobulbo), el pseudobulbo fue secado a la sombra, en donde se obtuvo 298.2 g del material vegetal seco, que posteriormente fue molido con un molino manual.

6.2 Obtención de los extractos diclorometano: metanólico (1:1) de la especie *Prosthechea livida*

Se obtuvo 81.3 g de bulbo seco y molido que fue macerado con una mezcla de disolventes diclorometano y metanol (50:50), donde permaneció en contacto directo con el disolvente por 72 horas, después fue filtrado y el exceso de disolvente se eliminó empleando un rota evaporador modelo R-200 (BUCHI® Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), al residuo vegetal se le adicionó disolvente limpio diclorometano y metanol (50:50), este procedimiento fue realizado por triplicado.

6.3 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios de EDMBPL

Se realizaron pruebas colorimétricas para determinar los posibles compuestos que presenta el EDMBPL.

6.3.1 Prueba de sulfato cérico $Ce(SO_4)_2$ para la determinación de la presencia de alcoholes y polialcoholes

Para utilizar el revelado con $Ce(SO_4)_2$ primero, se realizó una placa cromatográfica en capa fina la cual fue revelada con 95% diclorometano y 5% metanol, posteriormente se le añade 0.5 ml de sulfato cérico y es calentada a 20° C, durante 3 minutos, debido a que se lleva a cabo la oxidación de los alcoholes formando aldehídos o ácidos carboxílicos.

6.3.2 Prueba de cloruro férrico para la determinación de compuestos fenólico y taninos

Es una prueba colorimétrica que se utiliza para determinar la presencia de grupos fenólicos, en una placa de porcelana se coloca en un pozo cloruro férrico disuelto con metanol, posteriormente se añadió el EDMBPL, si la prueba es positiva el color debe tornar a púrpura, verde o azul, esto nos permite determinar la presencia de compuestos fenólicos, si presenta un color rojo -vino se confirma la presencia de taninos de tipo pirocatecólicos, si presenta un color verde intenso y de color azul presentará taninos de tipo pirogalol derivados del ácido gálico (Barrera Col., 2014).

6.3.3 Prueba de Dragendorff para el análisis de compuestos alcaloides

Para realizar la prueba de Dragendorff se utilizaron 0.5 gramos de bismuto pentahidratado disuelto en 1.25ml de ácido nítrico, al 30% con una solución de 6.8 gramos de yoduro de potasio en 12.5 ml de agua. Posteriormente se deja reposar durante 24 horas, se decanta y se afora a 20 ml. Si existe presencia de alcaloides se tornará a color naranja rojizo (Barrera Col., 2014).

6.3.4 Prueba de Liebermann- Burchard para la identificación de esteroides y triterpenos

Esta prueba colorimétrica permite reconocer la presencia de triterpenos y esteroides, primero se preparó una solución con 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético, en un tubo de ensaye se colocó el EDMBPL y después se le añadió la solución agregando además 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar, si la prueba es positiva se observa la presencia de estos compuestos se observan cambios de color de rosado- azul, verde intenso o verde oscuro- negro (Ardoino Col., 2017).

6.4 Separación y purificación de compuestos de *Prosthechea livida*

Para la separación de los compuestos del EDMBPL, se realizó un estudio fitoquímico biodirigido a través de una cromatografía en columna abierta (**Figura 3**), se utilizó como fase móvil una mezcla hexano-diclorometano-metanol en orden creciente de polaridad. Las fracciones primarias fueron reunidas por similitud cromatográfica utilizando cromatografía en capa fina. Los grupos de fracciones primarias se evaluaron para determinar su actividad vasorrelajante, y aquellas que resultaron más activas fueron sometidas a diversas técnicas cromatográficas y químicas para separar y purificar los compuestos responsables de la actividad biológica.



Figura 3 Cromatografía en columna abierta utilizada para la separación de los metabolitos secundarios del EDMBPL

6.5 Evaluación farmacológica

6.5.1 Animales

Para establecer la actividad antidiabética y toxicológica se utilizaron ratones macho CD1 con un peso entre 25 y 30 g. Para la evaluación del efecto vasorrelajante, se utilizaron ratas macho de la estirpe wistar de peso entre 250 y 300 g. Finalmente, para determinar la actividad antihipertensiva se usaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con un peso entre 300 y 350 g. El uso de los animales fue siguiendo lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de

laboratorio, este proyecto fue sometido ante un comité de ética y bioseguridad para la evaluación toxicológica aprobado con el número B11-20 por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

6.5.2 Determinación de la actividad antihiper glucémica en un modelo *in vivo*

6.5.2.1 Curva de tolerancia a la glucosa

Para este experimento, se utilizó una población de 18 ratones los cuales se pusieron en ayuno de 8 horas antes del experimento con libre acceso a agua. Posteriormente, se pesaron y se formaron 3 grupos de investigación experimental cada uno con seis individuos (n= 6) **Tabla 4**. Luego a todos los ratones se les midió la glucosa inicial (T_0) con un glucómetro marca Accu-Chek guide y tiras reactivas de la misma marca.

Tabla 4 Diseño experimental para la determinación del efecto antihiper glucémico

INDIVIDUOS	TRATAMIENTO	TIEMPOS DE TOMA DE MUESTRA
6	Control (Glibenclamida)	0 min.
6	Extracto diclorometano/metanol bulbo <i>P. livida</i>	30 min. 1 h.
6	Vehículo (Tween 80 al 10%)	1.5 h. 2 h. 3 h.

Después de medir la glucosa inicial, al grupo control positivo se le administraron 5 mg/kg de glibenclamida, al grupo del EDMBPL se le administró 100 mg/kg disueltos en Tween 80 al 10% (vehículo) y al grupo vehículo se le administró Tween 80 al 10% (Control negativo). Media hora después, se les administró una carga de glucosa (2 g/kg) por vía oral. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal en los tiempos 0, 30 min., 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración como se muestra en la **Figura 4**.

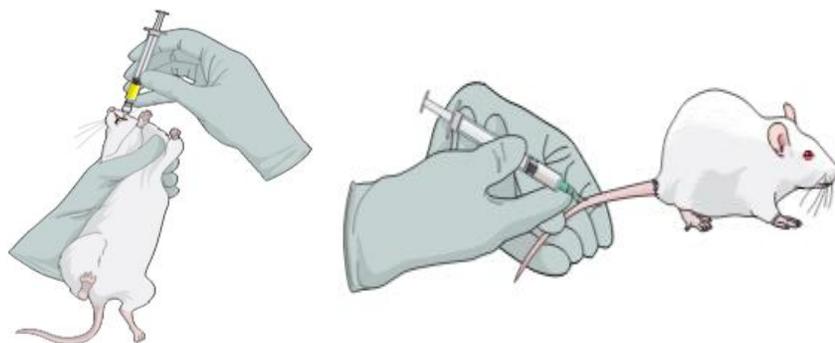


Figura 4 Curva tolerancia a la glucosa en donde se administra vía oral los diferentes tratamientos, y posteriormente se obtiene muestra de sangre por punción en la vena caudal en los diferentes tiempos (<https://mindthegraph.com/>).

Los valores obtenidos en los experimentos fueron evaluados con el software Graphpad-prisma 2018 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) el cual nos permite estudiar los efectos de dos fuentes de variación, para detectar cambios en la variación porcentual de la glucosa, en diferentes tiempos (30 min., 1, 1.5, 2 y 3) con el tratamiento (EDMBPL) y el vehículo Tween 80 al 10% (control negativo).

6.6 Determinación de la actividad antidiabética en un modelo *in vivo*

6.6.3.1 Inducción de diabetes no insulino dependiente experimental

Para llevar a cabo el modelo experimental de inducción de diabetes T2. Los animales se pusieron en ayuno 8 horas antes de iniciar la administración, y posteriormente, se administró vía intraperitoneal Nicotinamida (N) de lado derecho, a una dosis de 40 mg/kg disuelto en agua inyectable, después de 15 minutos se administró vía intraperitoneal 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ Sigma®) de lado izquierdo previamente disuelta en buffer de citratos frío a un pH 4.5.

Posterior a las dos semanas de la inducción, se monitorearon los niveles plasmáticos de glucosa a cada animal, utilizando un glucómetro marca Accu Check Guide® con las tiras reactivas para la determinación de glucemia en sangre Accu Check Guide®. Los animales seleccionados para el estudio fueron los que tenían niveles de glucosa por encima de 140 mg/dL.

6.5.3.2 Evaluación aguda del efecto antidiabético

Para la realización de este estudio los animales seleccionados se sometieron a un ayuno previo de 8 horas con libre acceso al agua. Los ratones fueron pesados y se midió la glucosa inicial (T_0) antes de la administración de la muestra de prueba.

Se formaron 3 grupos diferentes de experimentación con una $n=6$, utilizando como control positivo glibenclamida 5 mg/kg, extracto DMBPL a una dosis de 100 mg/kg y vehículo (tween 80 al 10%). Posteriormente, se midieron las glucosas a la 1, 3, 5 y 7 horas después de la administración (**Tabla 5**). Los valores obtenidos en los experimentos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) para analizar cambios en la variación porcentual de la glucemia.

Tabla 5 Evaluación aguda en ratones diabéticos, diferentes tratamientos y horas de medición de niveles de glucosa

INDIVIDUOS	TRATAMIENTO	TIEMPOS DE TOMA DE MUESTRA
6	Control (Glibenclamida)	0 min.
6	Extracto diclorometano/metanol bulbo <i>P. livida</i>	1 h. 3 h.
6	Vehículo (Tween 80 al 10%)	5 h. 7 h.

6.6 Efecto vasorrelajante de *P. lívida*

A los animales se les practicó eutanasia en una cámara con una sobredosis de éter etílico, donde posteriormente se realizó una disección abdominal, se aisló la aorta torácica, fue limpiada del tejido conectivo y adyacente cortada en segmentos de 4-5 mm de longitud (**Figura 5**), y fueron colocados en una cámara de incubación con 10 ml de solución de Krebs al 1%, la cual está formada por un conjunto de sales (EDTA, bicarbonato, dextrosa y Krebs al 10), se mantiene a una temperatura de 37°C, un pH de 7.4 y constantemente burbujeo de O_2/CO_2 (95:5%).

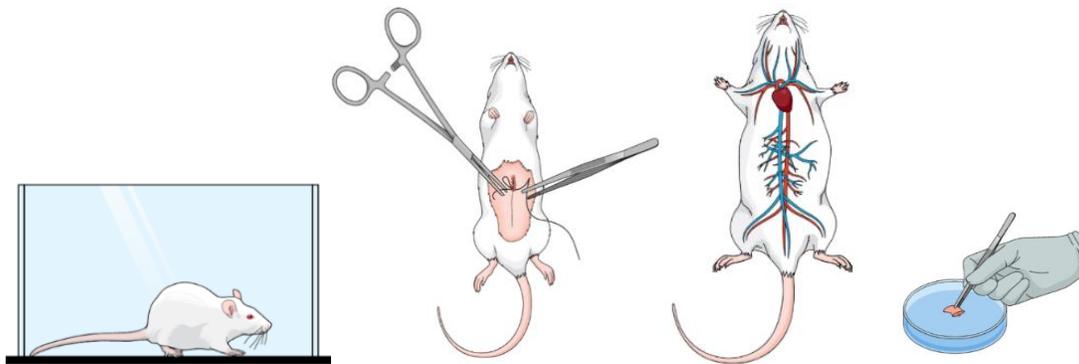


Figura 5 Extracción de la aorta de rata, realizando una disección abdominal y posteriormente limpiándola de tejido conectivo y cortada en segmentos (<https://mindthegraph.com/>)

Se utilizó un equipo de registro isométrico vertical donde el segmento de aorta se sujeta a la parte inferior de la cámara y a un transductor de fuerza isométrico vertical Grass FT03® conectado a un polígrafo digital BIOPAC®, posteriormente, el tejido se estabilizó y sensibilizó a una tensión de 3 g durante 30 minutos lavando cada 20 minutos y ajustando al valor inicial. Cada tejido fue sensibilizado mediante contracciones con NA 0.1 μM , por triplicado y después se realizó una cuarta contracción en donde fue evaluado el extracto DMBPL en diferentes concentraciones de forma acumulativa (**Figura 6**).

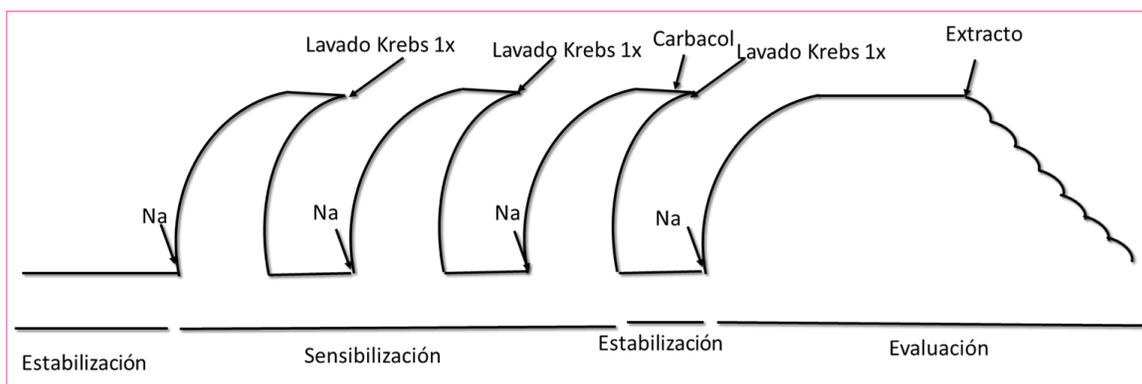


Figura 6 Evaluación del efecto vasorrelajante, comenzando con la estabilización del tejido, posteriormente sensibilizando con 3 contracciones de NA seguidas de un lavado y una cuarta contracción para la evaluación de los extractos (Figura propia).

6.6.1 Determinación del mecanismo de acción del EDMBPL de *Prosthechea livida*

6.6.2 Exploración del efecto vasorrelajante sobre los receptores Alpha - adrenérgicos

Se realizaron curvas acumulativas de NA en anillos de aorta de rata en ausencia de endotelio, en donde el tejido se estabilizó y sensibilizó a una tensión de 3 gramos durante 30 minutos, lavando cada 20 minutos y ajustando al valor inicial. Cada tejido fue sensibilizado mediante contracciones con NA 0.1 μM , después de que el tejido fue lavado con la solución fisiológica, se agregaron las diluciones de NA de forma acumulativa y una vez que se alcanzó la contracción máxima, los tejidos fueron lavados con solución Krebs y se dejó estabilizar el tejido a la condición basal. Posteriormente, se realizó por segunda vez el procedimiento descrito. Una vez que los tejidos estuvieron en reposo, se agregaron 502 $\mu\text{g/ml}$ del extracto e inmediatamente se construyó la curva concentración-respuesta acumulativa de NA, como se muestra en la **Figura 7**.

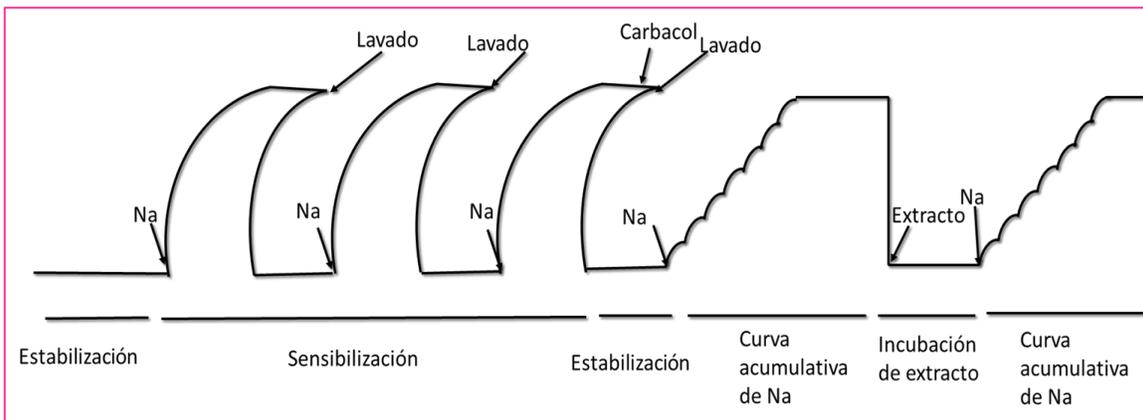


Figura 7 Determinación del mecanismo de acción por curvas acumulativas de NA, en aorta aislada de rata en ausencia de endotelio (Figura propia).

6.6.3 Evaluación del mecanismo de acción por bloqueo de Canales de Calcio

Se realizaron curvas acumulativas de CaCl_2 en anillos de aorta de rata en ausencia de endotelio, en donde el tejido se estabilizó y sensibilizó a una tensión de 3 gramos durante 30 minutos, lavando cada 20 minutos y ajustando al valor inicial. Cada tejido fue sensibilizado mediante contracciones con NA $0.1 \mu\text{M}$ por triplicado, posteriormente, se realizó un lavado con Krebs KCl 80 mM, y a continuación se agregan las diluciones de CaCl_2 de forma acumulativa hasta llegar a la contracción máxima. Subsecuentemente, los tejidos son lavados y se agrega el extracto a evaluar ($502 \mu\text{g/ml}$), seguido de esto se adicionan nuevamente las diluciones acumulativas de CaCl_2 como se esquematiza en la **Figura 8**.

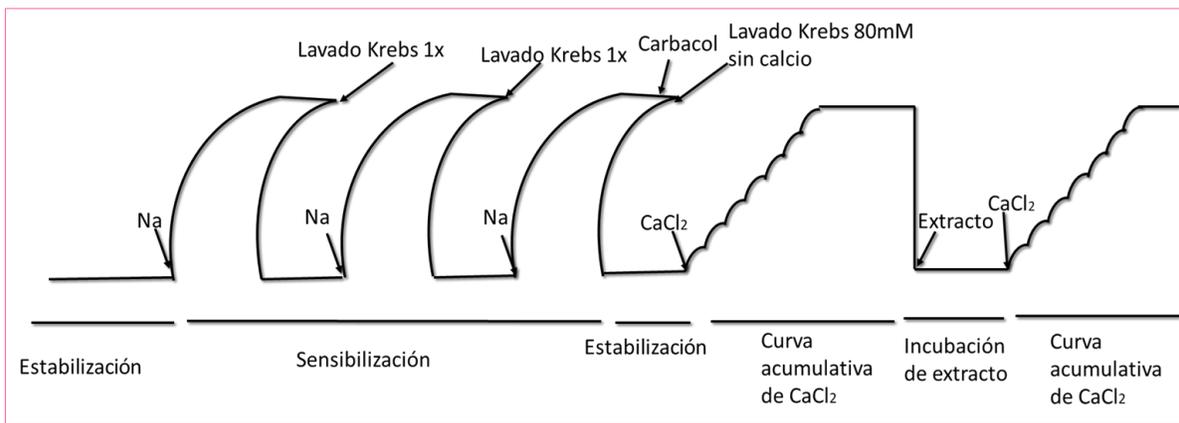


Figura 8 Determinación del mecanismo de acción por curvas acumulativas de CaCl_2 , en aorta aislada de rata en ausencia de endotelio (Figura propia)

6.6.4 Contracción inducida por calcio extracelular KCl 80 mM

El tejido se estabilizó y sensibilizó a una tensión de 3g durante 30 minutos lavando cada 20 minutos y ajustando al valor inicial. Cada tejido fue sensibilizado mediante contracciones con NA $0.1 \mu\text{M}$, seguidas de un lavado, esto se realiza por triplicado, y en la tercera contracción se agrega carbacol para determinar la presencia o ausencia de endotelio, se realizó una cuarta contracción con Krebs KCl 80 mM, posteriormente se agregan las diferentes diluciones del extracto DMBPL de forma acumulativa (**Figura 9**).

6.6.6 Determinación de la toxicidad aguda

Se utilizaron ratones macho de la estirpe ICR, los cuales se dividieron en 4 grupos con una n de 5 animales y se pusieron en ayuno durante 4 horas previas al ensayo. Posterior al ayuno, se administró vía intragástrica las dosis de prueba (5,25,50, 300 y 2000 mg/Kg) del extracto, empleando como vehículo tween 80 al 10%. Para probar la dosis de 2000 mg/Kg se utilizó como vehículo una emulsión de aceite de canola y agua destilada en una proporción de 70:30. Los animales se observaron individualmente después de la administración de los primeros 30 minutos, y durante las siguientes 24 horas poniendo especial atención las primeras 4 horas. Después se observaron diariamente hasta los 14 días. Al final de este periodo, se determinó el número de defunciones. Finalmente, de acuerdo con los resultados del extracto, este fue categorizado con lo establecido por la guía SGA (SGA, 2011).

6.6.7 Determinación de la toxicidad subaguda

Se formaron tres grupos de experimentación, el grupo 1 se administró con el extracto una dosis de 100 mg/Kg, el grupo 2 se le administró el vehículo tween 80 al 10% y grupo 3 el sham donde se le administró agua. Los tres grupos fueron administrados durante 28 días bajo las mismas condiciones y a la misma hora durante todo el experimento. Los animales se mantuvieron en observación y monitoreo de cambios físicos, para observar posibles variaciones en el peso de los animales como resultado de la administración de las muestras de prueba, estos grupos de animales fueron pesados al inicio, durante y al finalizar el experimento, para posteriormente determinar la diferencia de peso de cada ratón.

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (0.1ml/Kg) el día 29, se tomaron una muestra de sangre mediante punción cardíaca para determinar los parámetros bioquímicos relacionados con posible daño hepático y cardíaco. Se realizó la extracción de órganos de interés como hígado, riñón, corazón y cerebro, los cuales fueron lavados con solución salina, pesados y conservados en una solución de formaldehído para su posterior análisis histológico, en donde se llevaron a cabo las tinciones con hematoxilina.

Los valores obtenidos en los experimentos fueron evaluados con el software Graphpad-prisma 2018 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) en donde se realizó un ANOVA para determinar la variación entre los diferentes grupos de tratamiento (vehículo, control y extracto DMBPL).

6.7 Tinción de los cortes histológicos

Para realizar la tinción de los cortes histológicos de los órganos aislados primero se llevó a cabo la preparación del tejido, para impedir la degradación enzimática y endurecer el tejido por desnaturalización, los tejidos fueron colocados en formalina, posteriormente se lavaron y deshidrataron los tejidos en una serie de alcoholes de diferentes concentraciones, después se colocaron en xilol para quitar el exceso de alcoholes, y posteriormente colocar en parafina fundida, la cual una vez seca es cortada en forma de bloques.

Los cortes se realizaron con un microtomo con un grosor aproximado de 4 μM y fueron colocados en un portaobjetos, se pasó nuevamente por xilol y a una serie de alcoholes para así pasar por el colorante de hematoxilina, lavar y colocar un fijador y un cubreobjetos. La hematoxilina nos permite ver los núcleos de las células para determinar si se observa algún daño a nivel celular, cada uno de los cortes fue analizado en un microscopio marca Zeiss con los objetivos 10,20 y 40 X de resolución.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención del extracto diclorometano: metanol (1:1) de pseudobulbo *Prosthechea livida* (EDMBPL)

Este trabajo pretende estudiar a la especie *Prosthechea livida*, la cual fue seleccionada debido a un criterio etnomédico con base en su uso en la medicina tradicional, y debido al uso de varias especies del género junto con los antecedentes farmacológicos y fitoquímicos que se han realizado, atribuyéndole como alternativa para el control de la presión arterial y de la diabetes. Con base en esto, se llevó a cabo la maceración de *Prosthechea livida* (pseudobulbo) lo que permitió obtener el extracto orgánico (**Tabla 7**) con un peso total de 16.87 g y un rendimiento del 20.75%.

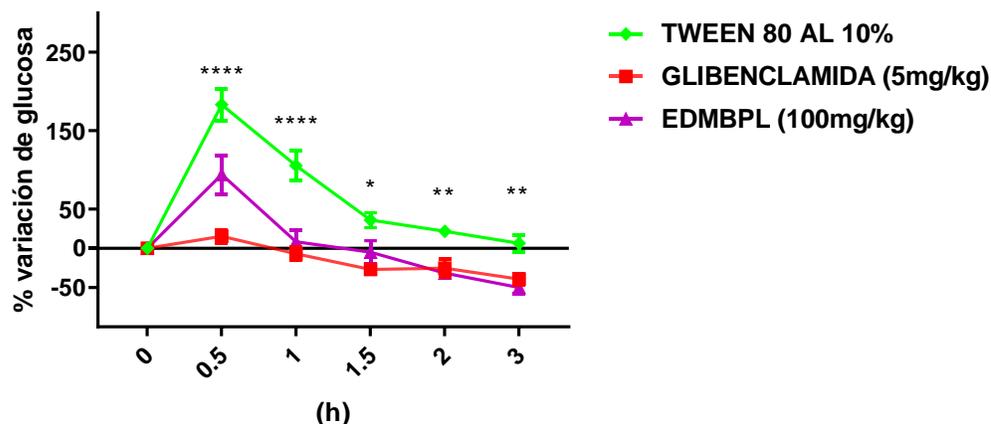
Tabla 7 Determinación del peso y de los rendimientos del extractos diclorometano/metanol de pseudobulbo de *Prosthechea livida*.

Extracto diclorometano/metanol (50/50)	Peso total	Rendimiento
pseudobulbo	16.87g	20.75%

7.3 Determinación del efecto antihyperglicémico

Para la determinación del efecto antihyperglicémico se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa (**Gráfica 1**) y curva de tolerancia a la sacarosa (**Gráfica 2**) del EDMBPL en animales sanos, para determinar la variación en los niveles de glucosa en los diferentes tiempos. En la **Gráfica 1** se muestra una curva de tolerancia a la glucosa y el efecto del EDMBPL sobre la misma, en donde se observa una diferencia significativa ($*p < 0.05$) en la disminución de los niveles de glucosa a la media hora, impidiendo el pico hyperglicémico, y manteniendo los niveles de glucosa bajos durante todo el estudio hasta las 3 horas, en comparación con los animales tratados con el vehículo (Tween 80 al 10%), pero no por debajo del control positivo (glibenclamida).

Curva de tolerancia a glucosa

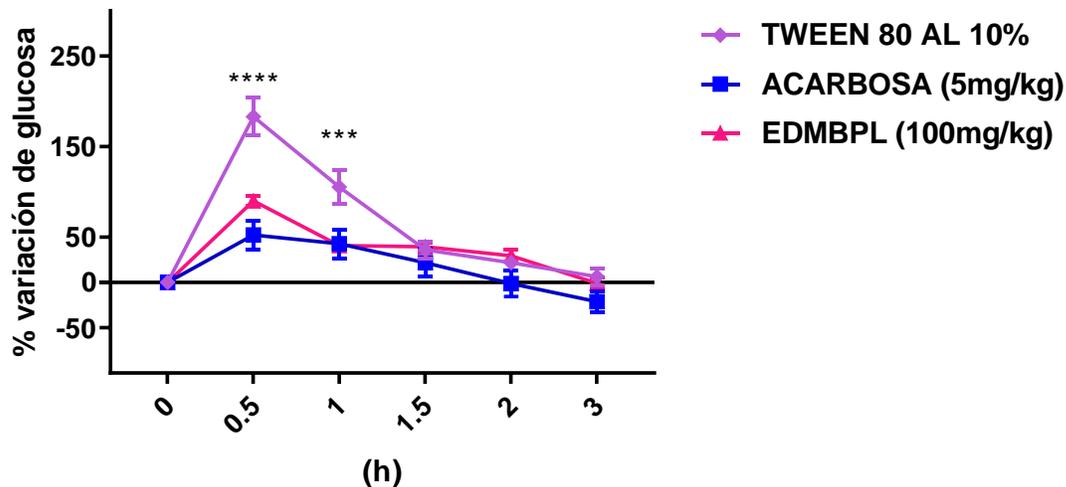


Gráfica 1 Curva de tolerancia a la glucosa del extracto diclorometano/metanol bulbo de *Prosthechea livida* (EMBPL) en donde * representa una diferencia significativa, en los diferentes tiempos, a 30 min, 1, 1.5, 2 y 3 horas con respecto al vehículo.

En este sentido, el hecho de que el extracto sea capaz de oponerse al pico hiperglicémico indica que el efecto pudiera estar relacionado con un bloqueo de los transportadores de glucosa dependientes de sodio o con el co-transportador GLUT-2 (Castro, 2012). Por otro lado, el efecto que se observa después de los 30 minutos puede ser provocado por un efecto secretagogo y/o por un aumento en la sensibilización de la función de la insulina (Calle, 2018) es necesario realizar otros experimentos para corroborar o descartar los mecanismos mencionados.

Así mismo, se realizó una curva de tolerancia a la sacarosa para determinar si el efecto pudiera involucrar una disminución en la degradación de los disacáridos por inhibición de alfa glucosidasas, en ratones normales. En la **Gráfica 2**, se puede observar que el extracto muestra una diferencia significativa ($*p < 0.05$) en la disminución de los niveles de glucosa a la media hora, impidiendo el pico hiperglicémico y manteniendo los niveles bajos de glucosa, durante todo el periodo de experimentación con respecto al grupo tratado con el vehículo. El efecto mostrado por el EDMBPL es muy parecido al efecto del control positivo (acarbosea), lo que podría sugerir una inhibición de las enzimas alfas-glucosidasas que descomponen los carbohidratos poliméricos a monómeros como glucosa y fructosa que son los que se absorben a torrente sanguíneo para obtener energía (Céspedes., Col. 2019).

Curva de tolerancia a la sacarosa

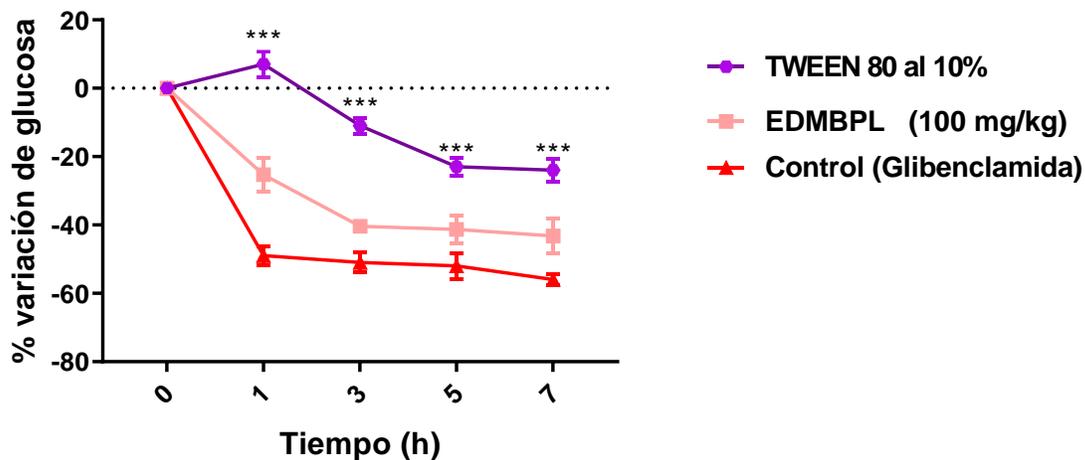


Gráfica 2 Curva de tolerancia a la sacarosa del extracto diclorometano/metanol bulbo de *Prosthechea livida* en donde * representa una diferencia significativa, en los diferentes tiempos, a 30 min 1, 1.5 y 2 horas con respecto al vehículo.

El efecto antihiper glucémico se les ha atribuido a los diferentes compuestos que presentan las orquídeas como flavonoides, taninos, alcaloides, fenoles, terpenos, estilbenos y fenantrenos en los cuales se ha demostrado que poseen actividad antidiabética. Se ha demostrado que algunas especies de las orquídeas presentan actividad antihiper glucémica, y en el género *Prosthechea* se han realizado diferentes estudios que muestran esta actividad, especialmente *Prosthechea michuacana* mostró una actividad antihiper glucémica significativa y sostenida durante los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos (Pérez Gutiérrez y Hoyos, 2011).

7.3.1 Evaluación aguda del efecto antidiabético

Se determinó el efecto antidiabético del EDMBPL en un modelo antidiabético no insulino dependiente. En la **Gráfica 3** se puede observar que existe una disminución significativa de los niveles de glucosa en el EDMBPL con respecto al vehículo (tween 80 al 10%), en los 4 diferentes tiempos, a la 1, 3, 5 y 7 horas después de la administración, en donde se utilizó como control positivo glibenclamida.

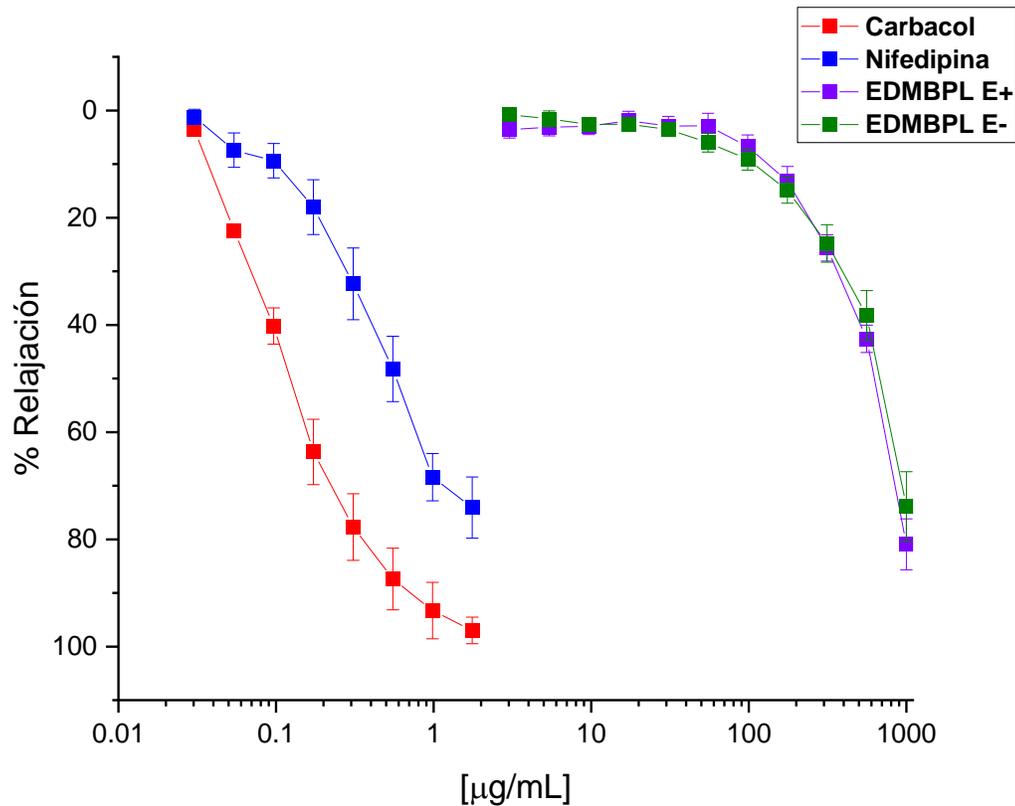


Gráfica 3 Evaluación de la actividad antidiabética del EDMBPL en donde se observa una reducción de glucosa a los diferentes tiempos 1,3,5 y 7 horas.

Se puede observar que el EDMBPL presenta un comportamiento similar a la glibenclamida, ya que es rápido y mantiene disminuidos los niveles de glucosa con respecto al control, por lo cual el extracto podría estar actuando de manera similar como las sulfonilureas, estimulando la secreción de insulina en las células β del páncreas (Pando-Álvarez, 2020). Sin embargo, no se pueden descartar mecanismos extrapancreáticos relacionados con la sensibilización de la función de la insulina (Cotos Corro, 2020).

7.4 Evaluación de la actividad vasorrelajante

El extracto EDMBPL presentó un efecto dependiente de la concentración en presencia de endotelio, con una eficiencia (E_{max}) del $80.93 \pm 4.74\%$ de relajación y una concentración efectiva media (CE_{50}) de $502.52 \pm 2.53 \mu\text{g/ml}$ (**Gráfica 4**). Debido al efecto que mostró en presencia de endotelio se decidió probar el extracto en anillos de aorta en ausencia de endotelio para verificar si el extracto actúa a través de mecanismos relacionados con el endotelio vascular o con mecanismos relacionados con el músculo liso del vaso sanguíneo. En donde el extracto mostró un efecto dependiente de la concentración en ausencia de endotelio, con una eficiencia (E_{max}) del $73.90 \pm 6.52\%$ de relajación y una concentración efectiva media (CE_{50}) de $536.9 \pm 4.6 \mu\text{g/ml}$ (**Gráfica 4**).



Gráfica 4 Efecto vasorrelajante del extracto diclorometano/metanol bulbo de *Prosthechea livida* en presencia de endotelio (E+) y ausencia de endotelio (E-). Donde no se observa diferencia significativa en el porcentaje de relajación en presencia y ausencia de endotelio.

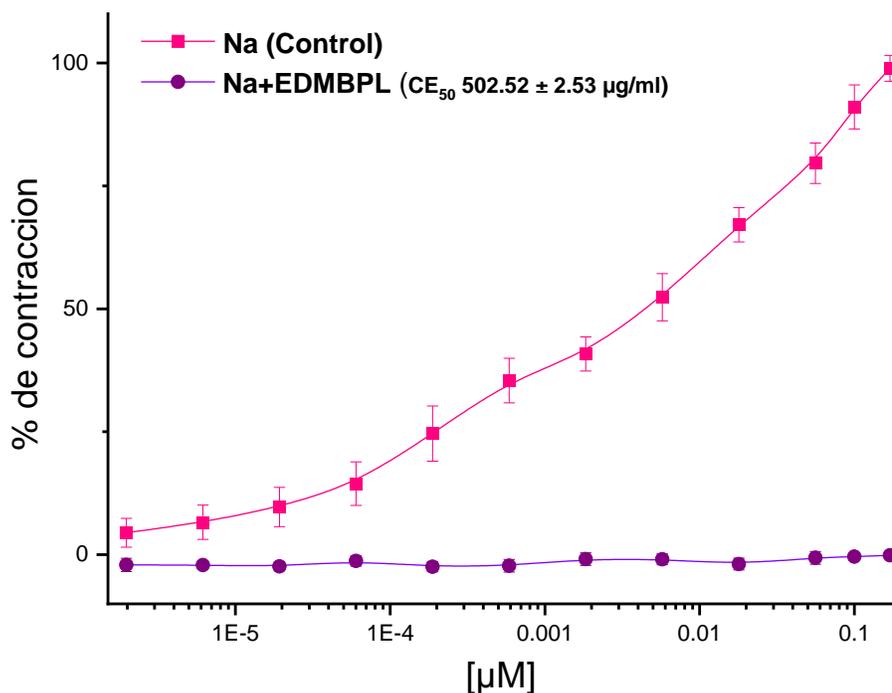
En la familia Orchidaceae se han realizado diferentes estudios para determinar el efecto vasorrelajante de diversas especies y especialmente en el género *prosthechea* se han realizado estudios en la especie *P. livida* en donde se han evaluado extractos de bulbo obtenidos con disolventes de diferente polaridad, en 2019 Gómez Pinedo reportó que el extracto metanólico en presencia de endotelio tiene un $E_{max}= 81.5\pm 5.46\%$, con $CE_{50}= 204.62\pm 5.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y en ausencia de endotelio de $E_{max}= 75.22\pm 9.06\%$ y una $CE_{50}= 401.25\pm 9.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Adicionalmente, Mulero en 2019, determinó que el extracto diclorometano: metanol (1:1) tiene un efecto vasorrelajante con un $E_{max}= 77.97\pm 5.29\%$ de relajación en presencia de endotelio y una $CE_{50}= 482.69\pm 5.81\mu\text{g}/\text{mL}$ y un $74.92 \pm 5.29 \%$ de relajación en ausencia de endotelio, con una $CE_{50}= 347.44\pm 1.96\mu\text{g}/\text{mL}$.

En este estudio se obtuvo que el EDMBPL en presencia de endotelio obtuvo un E_{max} del $80.93 \pm 4.74\%$ de relajación y una CE_{50} del $502.52 \pm 2.53 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, y en ausencia de endotelio un $E_{max} = 73.90 \pm 6.52\%$ con un $CE_{50} = 536 \pm 4.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, comparado con el extracto EDMBPL en el año 2019, puede variar en cuanto al porcentaje de vasorrelajación debido a que son diferentes colectas del material vegetal, sin embargo, no se obtiene una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de relajación.

Debido a que no se obtuvo una diferencia significativa en presencia o ausencia de endotelio vascular, se sugiere que el extracto podría estar generando su efecto vasorrelajante directamente sobre el músculo liso vascular (Vergara-Galicia., Col 2008). Esto es importante, debido a que muchos de los pacientes que padecen hipertensión llegan a desarrollar disfunción endotelial, siendo el músculo liso vascular uno de los principales blancos terapéuticos que podría llegar a provocar cambios en la presión arterial.

7.5 Mecanismo de acción del efecto vasorrelajante

7.5.1 Determinación del efecto vasorrelajante sobre los receptores Alpha-adrenérgicos

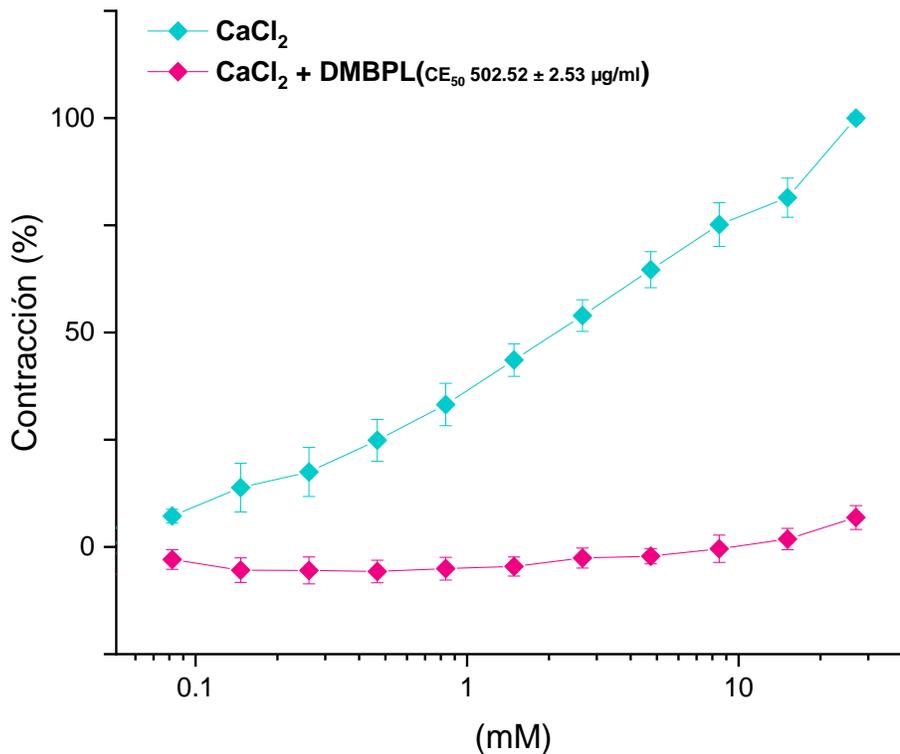


Gráfica 5 Efecto del extracto diclorometano/metanol de bulbo en la contracción inducida por NA (0.00001 μM a 10 μM) en anillos de aorta sin endotelio.

Se construyeron curvas concentración-respuesta del efecto acumulativo a noradrenalina en presencia y ausencia de la CE₅₀ del extracto DMBPL. Como se desprende de la **Gráfica 5**, se puede observar un efecto antagonista no competitivo, lo que sugiere un efecto alostérico al sitio activo del receptor o un posible efecto antagonista funcional, provocado por una interacción río abajo en la señalización posterior a la unión agonista-receptor (Vergara-Galicia, 2020). En este sentido, se decidió determinar el efecto sobre los canales de calcio de larga conductancia tipo L, el cual es el paso más importante para el proceso de contracción del tejido.

7.5.2 Exploración vasorrelajante sobre canales de calcio con contracciones acumulativas de CaCl₂

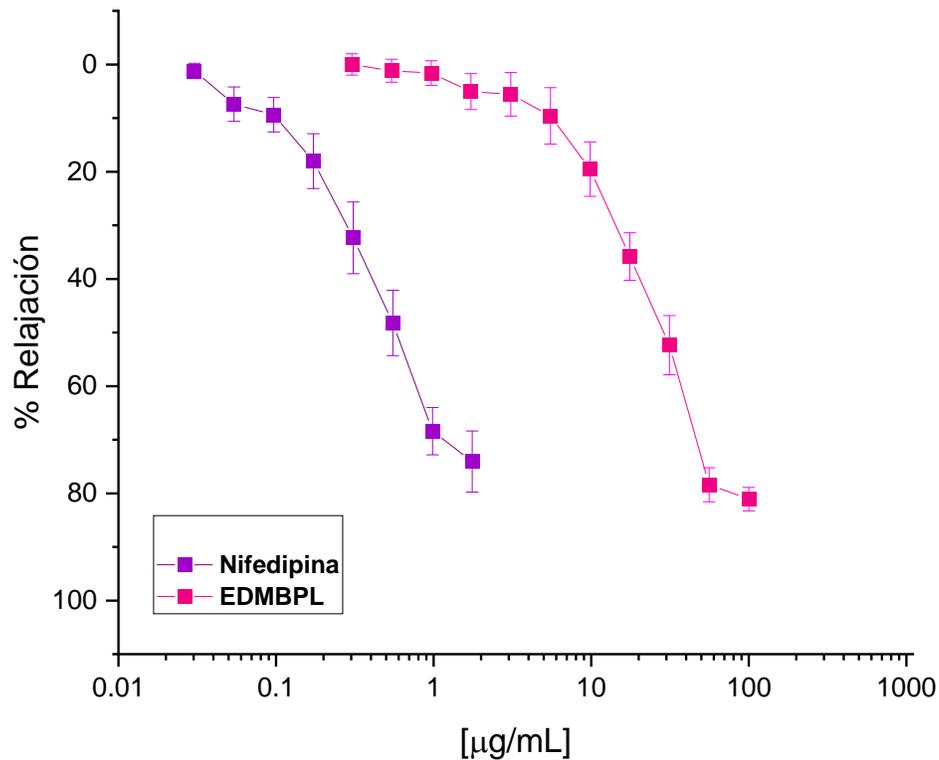
Uno de los pasos más importantes es la contracción inducida por diferentes agonistas que interaccionan con receptores acoplados a proteína G es el aumento del calcio intracelular de la parte exterior (Valle Rodríguez, 2006). En este sentido, se decidió realizar un experimento en donde se incubaron los segmentos de aortas aislada de rata en solución fisiológica de Krebs sin calcio, y se agregan, de manera acumulativa, diferentes concentraciones de CaCl₂. Esta acción permite una apertura de los canales de calcio tipo L, que, al ir ingresando al interior de las células musculares lisas, inducen una contracción dependiente de las concentraciones de calcio (Tovar, 2020). Así, al pre-incubar el extracto activo a la CE₅₀ se observó una inhibición completa de la contracción, por lo que se puede establecer que el mecanismo de acción está relacionado con el bloqueo de canales de calcio (**Gráfica 6**).



Gráfica 6 Efecto del extracto diclorometano/metanol bulbo de *Prosthechea livida* en la contracción inducida por CaCl₂ en anillos de aorta sin endotelio.

7.5.3 Contracción inducida por calcio extracelular KCl 80 mM

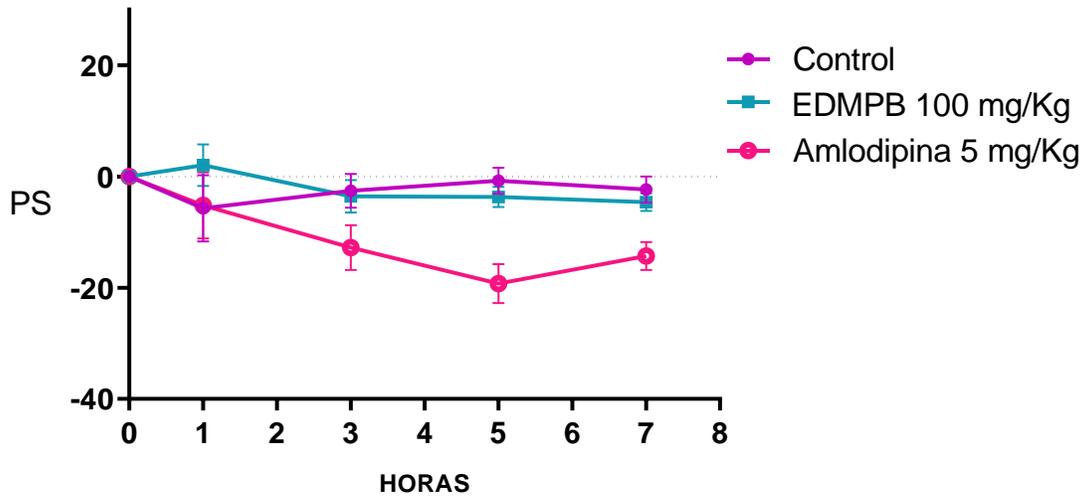
Con el objeto de corroborar el mecanismo de acción por bloqueo de canal de calcio, se evaluó el efecto del extracto sobre la contracción inducida KCl 80 mM, el cual provoca hiperpolarización de la membrana y favorece la entrada del calcio extracelular a través de los canales de calcio de larga conductancia (Valle Rodríguez, 2006). En este sentido, el extracto induce un efecto vasorrelajante dependiente de la concentración (**Gráfica 7**), lo que corrobora que el extracto bloquea los canales de Calcio y de esta manera disminuye la contracción comenzando a relajar el músculo liso, comparada con el control nifedipina se puede observar que el extracto DMBPL tiene una mayor eficacia (E_{max} = de 81.07 ± 2.18 %), sin embargo, es menos potente que el control positivo mencionado.



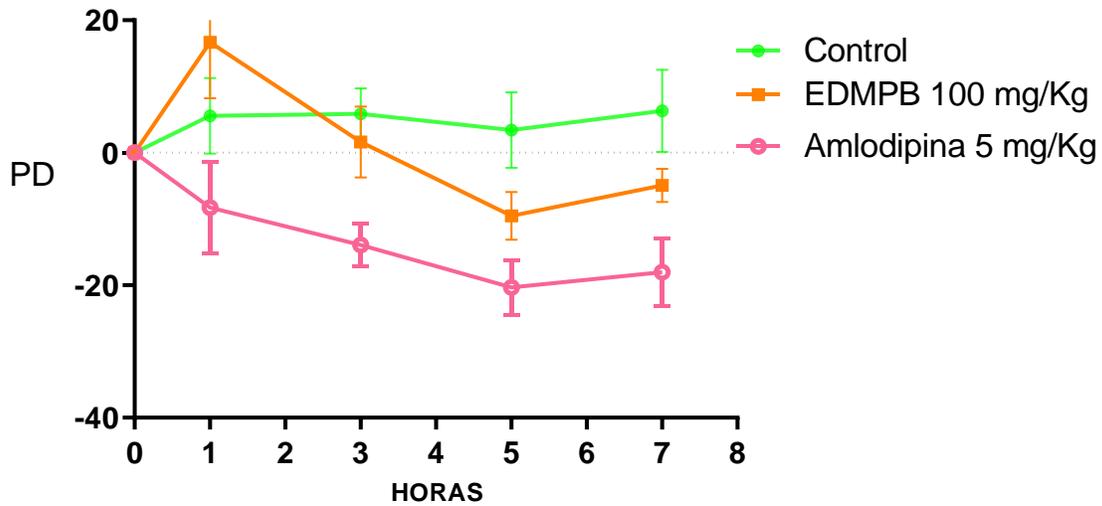
Gráfica 7 Curva de contracción con calcio extracelular, donde se observa un bloqueo de canales de calcio obteniendo un Emax de 81.07 ± 2.18 .

7.5.4 Determinación de la actividad antihipertensiva

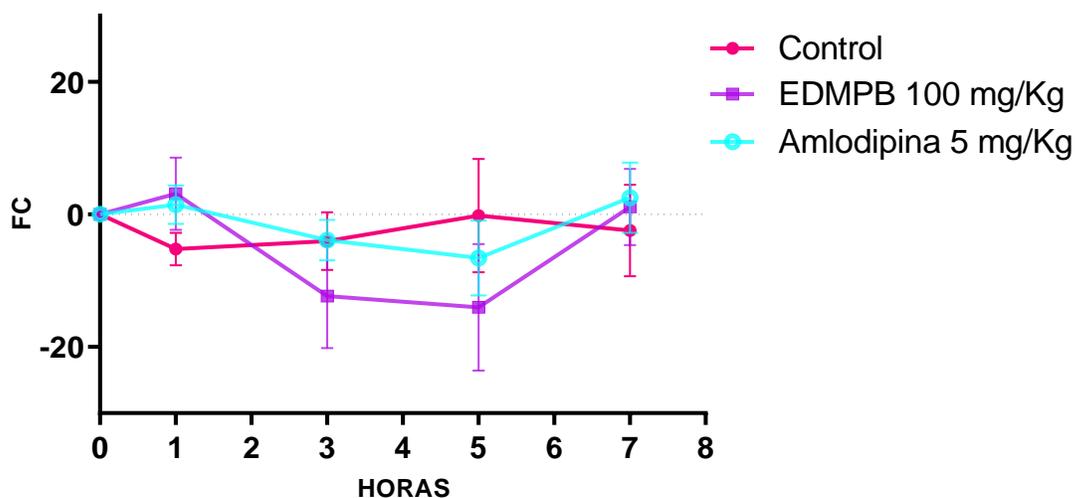
Una vez que se determinó el efecto vasorrelajante y el mecanismo de acción del EDMBPL, se realizó la evaluación del efecto antihipertensivo en ratas SHR, sin embargo, el EDMBPL no presentó un efecto antihipertensivo significativo a una dosis de 100 mg/kg, en los parámetros que fueron evaluados PAS (**Gráfica 8**), PAD (**Gráfica 9**) y FC (**Gráfica 10**), esto puede ser debido a que en un modelo *in vivo* intervienen diferentes factores que en un modelo *ex vivo*, como la absorción, distribución y metabolismo del extracto.



Gráfica 8 Parámetros de Presión arterial sistólica en ratas SHR, con administración de EDMBPL, en donde no se observó ninguna diferencia significativa comparado con el control.



Gráfica 9 Parámetros de Presión arterial Diastólica en ratas SHR, con administración de EDMBPL, en donde no se observó ninguna diferencia significativa comparado con el control.



Gráfica 10 Determinación de la frecuencia cardiaca en ratas SHR, con administración de EDMBPL, en donde no se obtuvo diferencia significativa comparadas con el control.

7.6 Fraccionamiento primario biodirigido del EDMBPL

Se realizó una cromatografía en columna abierta para la separación y posible purificación de los compuestos bioactivos. La columna se inició con una fase móvil de hexano al 100%, después diferentes mezclas de hexano/diclorometano, diclorometano/metanol y finalizando con metanol al 100%, cada fracción obtenida fue de 60ml, se obtuvieron 310 fracciones, las cuales fueron reunidas por similitud en cromatografía en capa fina, para posteriormente obtener un total de 8 fracciones finales y 2 compuestos puros (**Figura 10**).

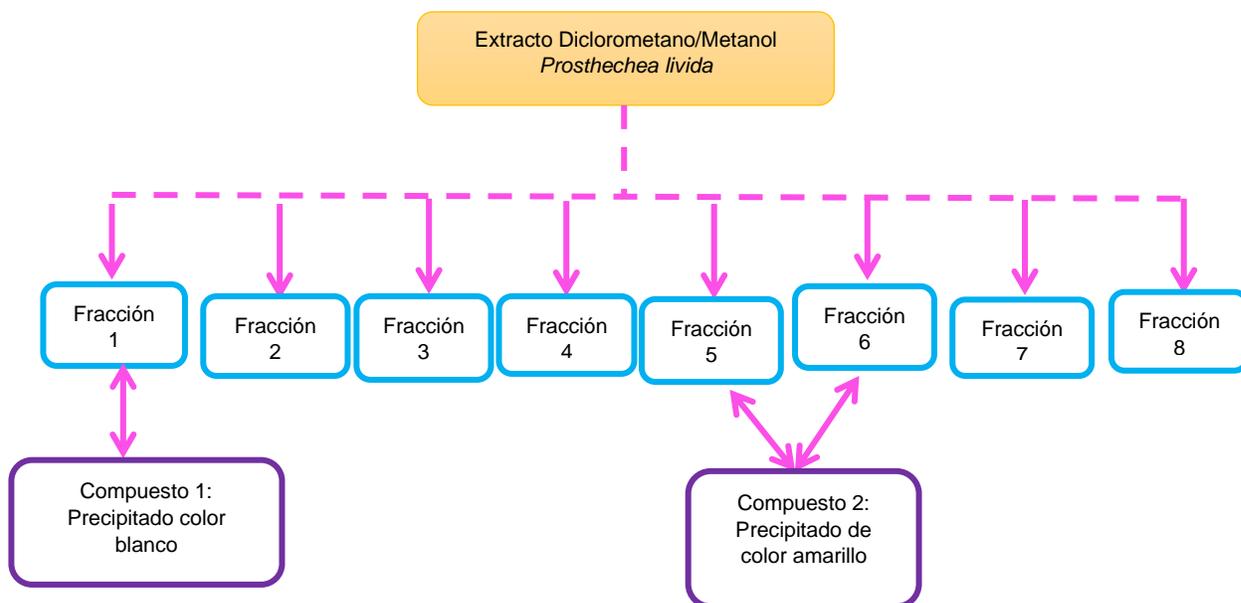
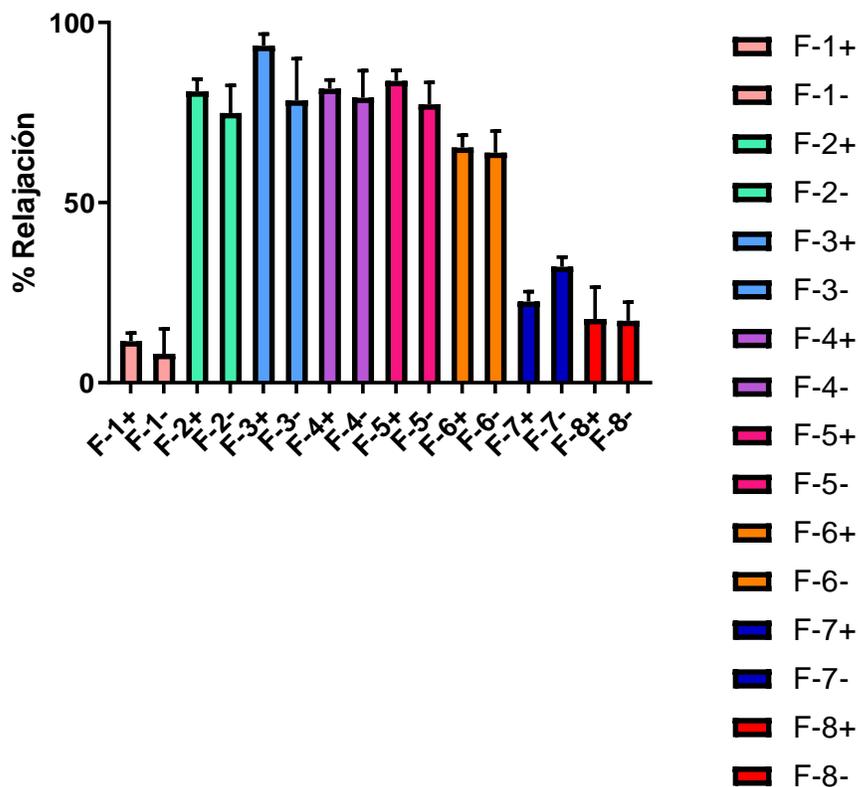


Figura 10 Esquema de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, donde se obtuvieron 8 fracciones y 2 compuestos.

7.6.1 Determinación del efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas del EDMBPL

Se determinó el efecto vasorrelajante de las 8 fracciones obtenidas, en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio (**Grafica 11**) donde se puede observar que las fracciones más activas son de la fracción 2 a la fracción 6, siendo independientes de la presencia de endotelio, la fracción 3 fue la más activa con un $93.53 \pm 3.2\%$ de relajación en presencia de endotelio y $79.39 \pm 3.5\%$ de relación en ausencia de endotelio.



Gráfica 11 Determinación de la actividad vasorelajante en presencia y ausencia de endotelio, de las fracciones obtenidas en la columna cromatográfica.

7.2 Caracterización cualitativa de metabolitos secundarios de EDMBPL

Con el fin de conocer los posibles grupos funcionales de los metabolitos secundarios que presenta el EDMBPL, se decidió realizar algunas pruebas colorimétricas para determinar la presencia de alcoholes, esteroides, triterpenos, alcaloides, fenoles y taninos.

7.2.1 Revelado de placas cromatográficas con Sulfato cérico

Este reactivo nos permite determinar la presencia de alcoholes y polialcoholes y otros grupos funcionales que pueden ser oxidados, y como se observa en la **Figura 11**, existen manchas en la placa cromatográfica con una coloración marrón, esto se da debido a que se lleva a cabo la oxidación de los alcoholes formando aldehídos ($R-CHO$) o ácidos carboxílicos ($R-COOH$), esto en alcoholes primarios, en los secundarios se forman cetonas ($R^1R^2C=O$) (Rodríguez-Ocaña, 2015).

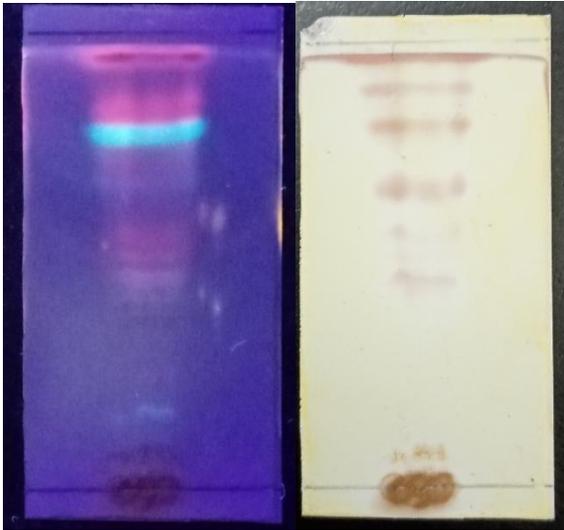


Figura 11 Revelado de Placa cromatográfica del EDMBPL con una polaridad 95% diclorometano y 5% metanol, observado con luz ultravioleta a 365nm y revelada con sulfato cérico.

7.2.2 Prueba colorimétrica de Liebermann- Burchard para la determinación de metabolitos secundarios

La reacción de Liebermann-Burchard es una prueba colorimétrica que se utiliza para determinar la presencia de compuestos esteroides y triterpenos, como se observa en la **Figura 12** el EDMBPL presenta compuestos de este tipo, debido a que al añadir el reactivo de Liebermann-Burchard cambia a un color verde oscuro, esto debido a la presencia del grupo hidroxilo (-OH), el cual reacciona aumentando la conjugación de la insaturación en el anillo condensado adyacente (Burke Col., 1974).

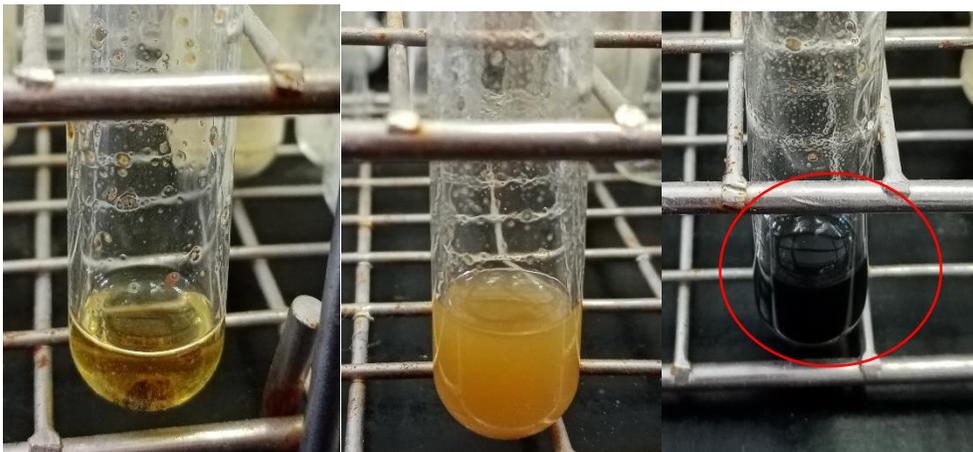


Figura 12 Prueba de Liebermann- Burchard, para determinar la presencia de compuestos fenólicos y taninos, en donde se observa que el EDMBPL al añadirle el reactivo cambia a un color verde oscuro, indicando la presencia de estos compuesto.

7.2.3 Prueba con reactivo Dragendorff para determinar la presencia de alcaloides en el EDMBPL

Los alcaloides son metabolitos secundarios que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, se generan a partir de aminoácidos, como se puede observar en la **Figura 13** el EDMBPL presenta compuestos de tipo alcaloide al presentar algunas bandas de color naranja, debido a que estas reacciones se basan en la capacidad de los alcaloides de combinarse con el yoduro de bismuto, estos forman yoduros dobles insolubles de fórmula general $Bil_3B \cdot HI$ (Barrera Col., 2014). Sin embargo, las bandas son muy tenues, lo que permite pensar que las concentraciones de alcaloides son bajas.

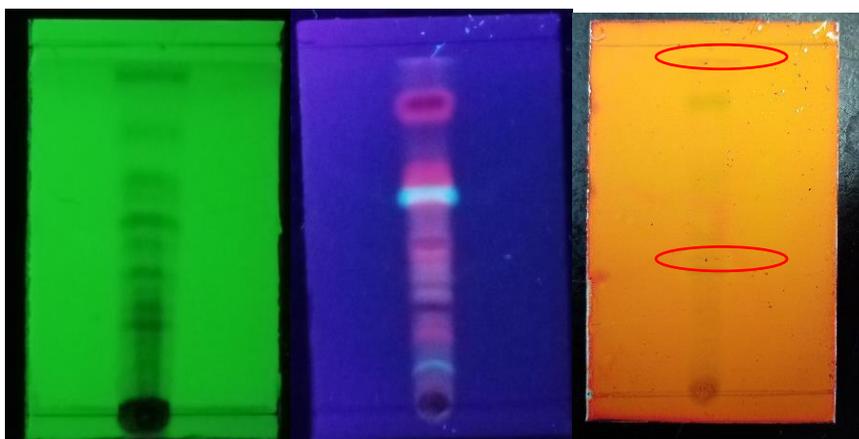


Figura 13 Revelado de Placa cromatográfica del EDMBPL con una polaridad 97% diclorometano y 3% metanol, observado con luz ultravioleta a 254nm y 365nm, posteriormente revelada con el reactivo Dragendorff.

7.2.3 Revelado con Cloruro férrico ($FeCl_3$) para la determinación de compuestos fenólicos y taninos.

La prueba con $FeCl_3$ es una prueba colorimétrica para determinar la presencia de fenoles y taninos, en el cual el $FeCl_3$ actúa como catalizador de reacciones de alquilación de benceno, el EDMBPL al añadir el $FeCl_3$ presentó un cambio de color a verde oscuro indicando la presencia de estos compuestos (Barrera Col., 2014).

Revelado con $FeCl_3$ en la **Figura 14** se observa en (1) el $FeCl_3$ disuelto con metanol al 100%, en el (3) se observa el EDMBPL disuelto en diclorometano metanol al 100%, y en el (2) se observa la reacción del EDMBPL al añadir el $FeCl_3$, en donde se torna de color verde intenso indicando la presencia de compuestos fenólicos y taninos.

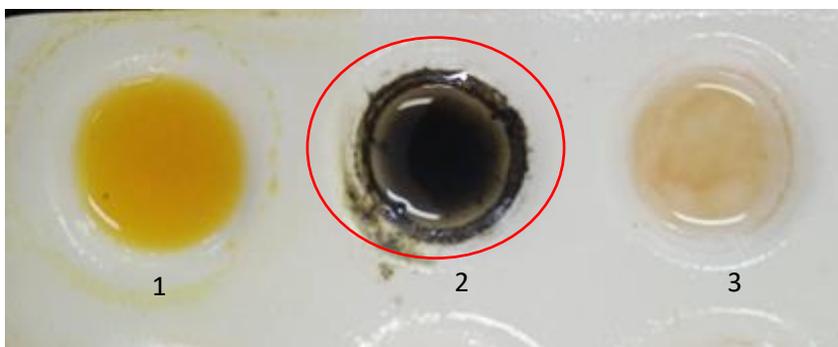


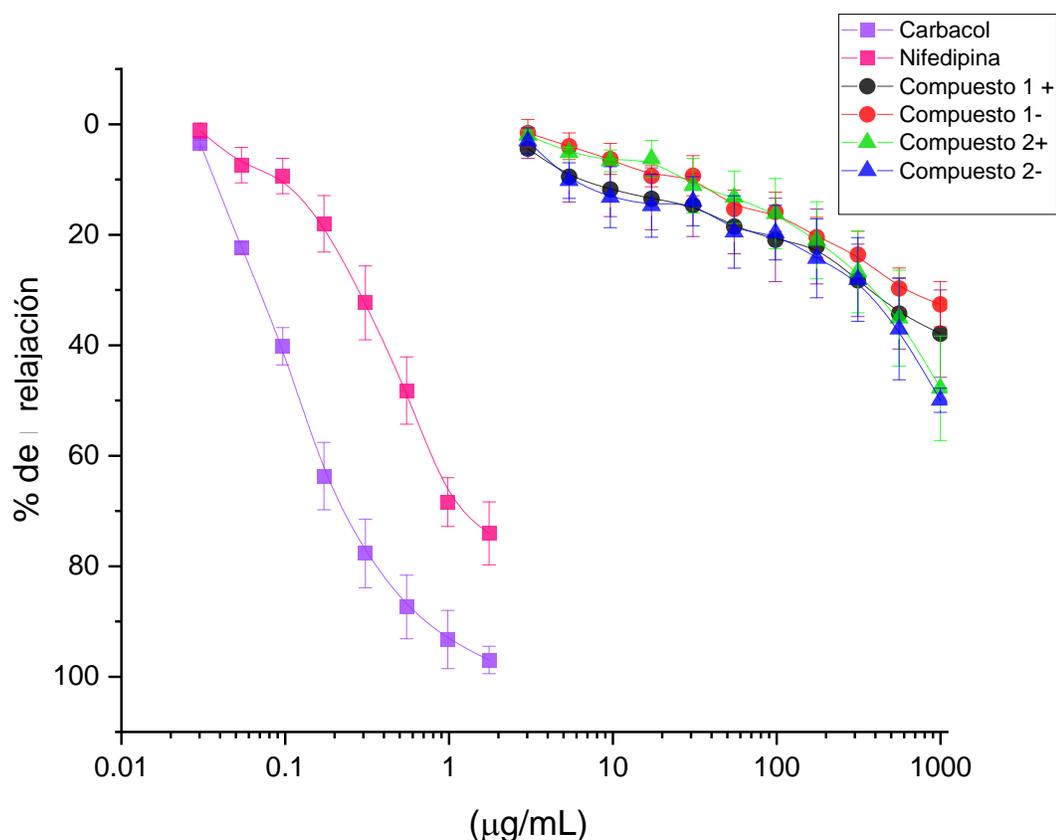
Figura 14 Revelado con FeCl_3 en donde se observa en la reacción del EDMBPL al añadir el FeCl_3 , en donde se torna de color verde intenso indicando la presencia de compuestos fenólico y taninos.

7.7 Caracterización de los compuestos aislados

Se obtuvieron 2 compuesto cuya resonancia magnética se encuentra en proceso, estos compuestos contenían impurezas y fueron limpiados por precipitación y decantación utilizando mezclas de hexano y diclorometano. El compuesto **1** se obtuvo como un precipitado de color blanco proveniente de la fracción 1, con un peso de 0.0121g, con un punto de fusión superior a 280°C . El compuesto **2** se obtuvo de las fracciones 5 y 6, es un precipitado de color amarillo con un peso de 0.076g y con un punto de fusión de 178°C . Con lo mencionado anteriormente en las pruebas colorimétricas, nos permite sugerir que se trata de compuestos fenólico o esteroides.

7.8 Determinación de la actividad vasorrelajante de los compuestos obtenidos

Se determinó el efecto vasorrelajante de los 2 compuestos obtenidos en la cromatografía en columna con el fin de comprobar el porcentaje de relajación que presentan, en la **Gráfica 12** se puede observar que ambos presentan un efecto independiente de la presencia de endotelio y dependiente de la concentración con un efecto vasorrelajante del compuesto **1** $E_{\text{max}+} = 37.922 \pm 7.90\%$, $E_{\text{max}-} = 32.60 \pm 4.08\%$; y del compuesto **2** $E_{\text{max}+} = 47.79 \pm 9.45 \%$, $E_{\text{max}-} = 49.97 \pm 2.19\%$ de relajación.



Gráfica 12 Evaluación del efecto vasorrelajante de los compuestos obtenidos de la columna cromatográfica.

En la **Gráfica 12** se observa que los compuestos **1** y **2** no presentaron un efecto vasorrelajante significativo, lo que sugiere dos cosas: la primera es que estos compuestos no sean los responsables del efecto vasorrelajante observado en el extracto, y la otra, es que al existir un efecto relajante discreto, estos puedan presentar un sinergismo con otras moléculas que están en el extracto y que no han sido aisladas, lo que ocasiona que el efecto sea potenciado debido a que se suma de los efectos individuales de dichos compuestos (Jabel, 2018).

7.9 Evaluación de la toxicidad aguda para determinar la DL₅₀

Una vez que se demostró el potencial terapéutico experimental de un extracto o de compuestos bioactivos en desarrollo, se sugiere determinar la seguridad en su uso, y se sugiere que dichos estudios sean realizados en modelos animales íntegros (modelos *in vivo*), siendo los más usados los recomendados por la OECD.

Tabla 8 Grupos del estudio de toxicidad aguda (n=5) por grupo.

Grupo	Dosis	Vehículo	Cambios físicos	Defunciones
1	5 mg/Kg	Tween 80 al 10%	Absceso en el brazo izquierdo	0
2	25mg/Kg		Ninguno	0
3	50 mg/Kg		Ninguno	0
4	300 mg/Kg		Ninguno	0
5	2000 mg/Kg	Aceite de canola	Ninguno	0

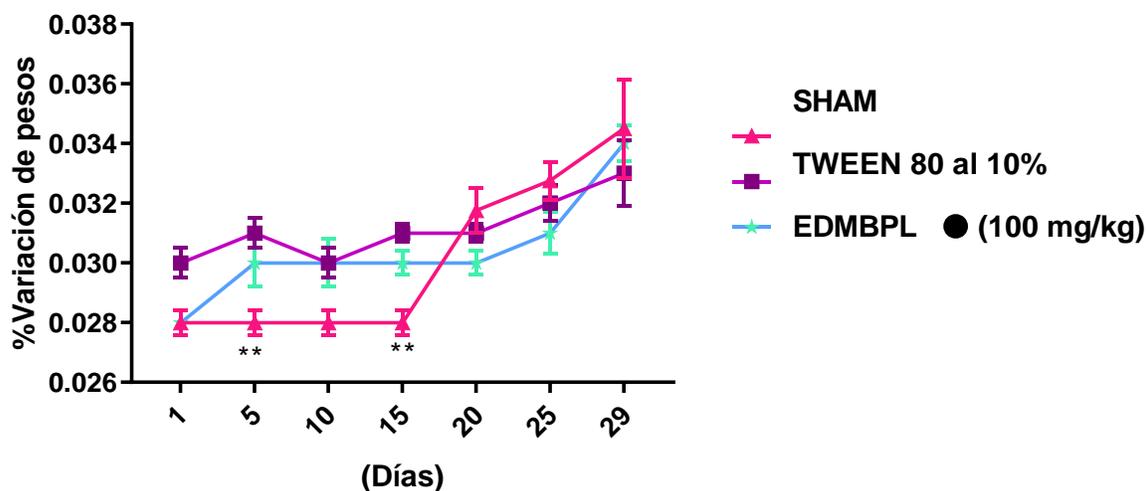
Así los animales (n=3) fueron administrados con diferentes dosis como se indica en la **Tabla 8**. Después de 24 horas de la administración, no se observó ninguna defunción en ninguno de los grupos, sin embargo, en la dosis de 5 mg/Kg se pudo observar en uno de los ratones un absceso en el brazo izquierdo, debido a esto y de acuerdo con la guía OECD 423, se decidió evaluar una dosis media de 25 mg/Kg en donde no se observó ningún cambio físico en los ratones y ninguna defunción, por lo tanto, de acuerdo con la guía GHS el extracto diclorometano/metanol de bulbo se clasifica en la categoría 4, en donde puede ser nocivo en caso de ingestión (**Tabla 9**).

Tabla 9 Clasificación de la toxicidad aguda de sustancias químicas de acuerdo con la guía GHS.

GHS	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5
Símbolo de comunicación de peligro					Sin símbolo
Palabra de advertencia	Peligro	Peligro	Peligro	Atención	Atención
Indicación de peligro	Mortal en caso de ingestión	Mortal en caso de ingestión	Tóxico en caso de ingestión	Nocivo en caso de ingestión	Puede ser nocivo en caso de ingestión
DL ₅₀ mg/Kg	5	50	300	2000	5000

7.10 Evaluación de la toxicidad subaguda

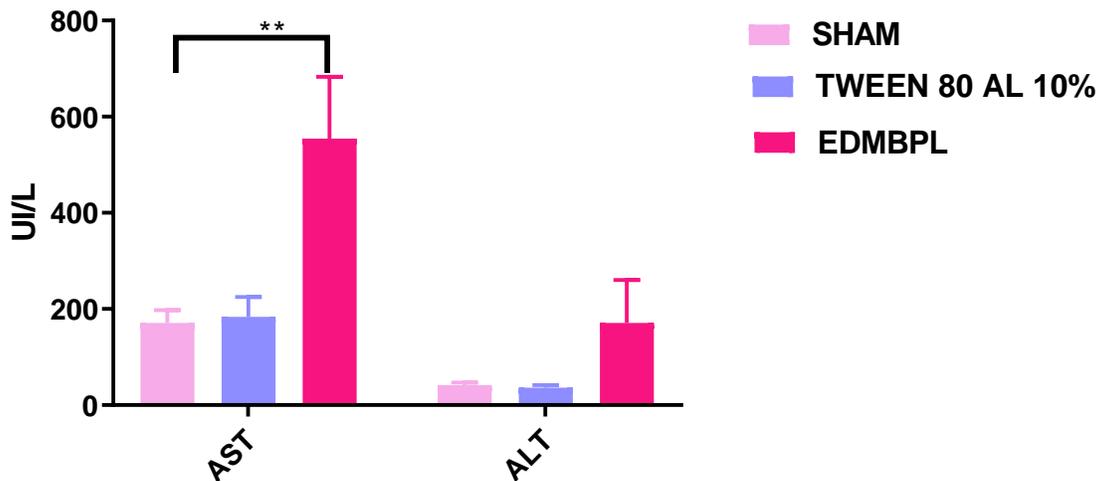
Debido a que en la evaluación de toxicidad aguda no se pudo determinar la DL₅₀, se decidió realizar la evaluación de toxicidad subaguda con una dosis exploratoria de 100 mg/Kg, esto con base en que es la dosis experimental establecida para evaluar la actividad antihipertensiva en modelos *in vivo* (ratas SHR).



Gráfica 13 Variación de pesos de los ratones en los 28 días de los diferentes tratamientos utilizados (sham, vehículo y extracto).

Con lo que respecta al monitoreo del peso de los ratones macho durante los 29 días de la administración, se puede observar que no existe una diferencia significativa en cuanto al aumento de pesos entre el vehículo (tween 80 al 10%) y el extracto estudiado. Se observó que los pesos se mantuvieron muy similares durante todo el ensayo, y solamente aumentaron de 2 a 4 gramos, sin embargo, existe una diferencia significativa (**) entre el vehículo y el sham (Control), en los primeros días debido a que el grupo sham no aumentó de peso durante los primeros 15 días, sin embargo, posteriormente no hubo diferencia significativa respecto al grupo vehículo y el grupo sham.

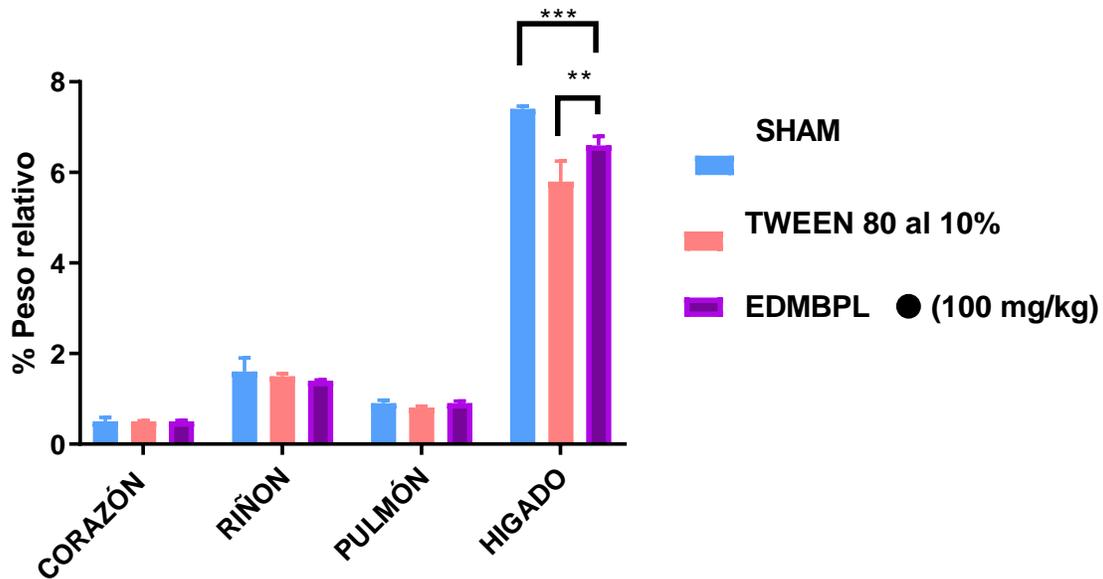
NIVELES DE TRANSAMINASAS



Gráfica 14 Niveles de transaminasa para determinar si existe un posible daño en el hígado.

Se determinaron los niveles de transaminasas (aspartato y alanina aminotransferasa) para establecer si existe un aumento de sus niveles en el suero. En la gráfica 14 se observa que existe una diferencia significativa en cuanto al aumento de las enzimas aspartato (AST) y alanina aminotransaminasa (ALT) del extracto DMBPL, con respecto al vehículo tween 80 al 10% y el grupo sham, esto se debe a que el hígado, al ser uno de los principales órganos en donde se metabolizan los fármacos, puede presentar daño o hepatotoxicidad, causada por la administración del extracto durante los 28 días.

Por otro lado, en la **Gráfica 15** se puede observar que entre los órganos corazón, riñón y pulmón no existe una diferencia significativa en cuanto al aumento o disminución del peso de los mismos, con respecto al vehículo y el grupo sham, esto nos indica que el extracto no ocasiona daño a nivel celular en los diferentes órganos (corazón, riñón y pulmón), sin embargo, se observa que existe una disminución significativa (***) entre el peso relativo de hígado del grupo sham y el extracto diclorometano/metanol bulbo de *Prosthechea livida* en donde a su vez el extracto también presenta una diferencia significativa (**) con respecto al vehículo, por lo tanto el extracto podría estar causando algún tipo de daño, y para corroborar algún cambio morfológico se realizaron cortes histológicos.



Gráfica 15 Variación de pesos de los diferentes órganos aislados de ratones tratados con tres diferentes tratamientos sham (agua), tween 80 al 10% y EDMBPL.

7.11 Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos de los diferentes órganos **Figura 15** para poder observar si existía algún daño a nivel celular por medio de una tinción con hematoxilina corroborando su morfología.

En el corazón se puede observar que tanto las fibras musculares (A), como los núcleos (B), no presentan daño en ninguno de los tres tratamientos utilizados, en los tejidos de riñón también se observan que no hubo daño a nivel celular debido a que los glomérulos (C) en donde se lleva a cabo la filtración de la sangre y se forma la orina, los túbulos proximales que realizan la reabsorción y secreción casi total de los principales solutos, se encuentran de forma normal en los tres tratamientos. En los pulmones no existe daño alguno en los alvéolos (D), y en los septos interalveolares (E), los cuales son sacos muy delicados debido a que en ellos se realiza el intercambio de oxígeno con la sangre.

Uno de los órganos más importantes en el metabolismo de cualquier sustancia es el hígado, y al observar cambios significativos en el análisis de transaminasas fue necesario hacer un análisis detallado de los posibles cambios observados a nivel celular, en las micrográficas de la **Figura 15** se observa inflamación en la arteria hepática así como la pérdida de linfocitos cercanos a la vena porta (F), células binucleares (G) debido a la regeneración activa por una replicación celular, hepatocitos con núcleos grandes (H), necrosis activa mínima.

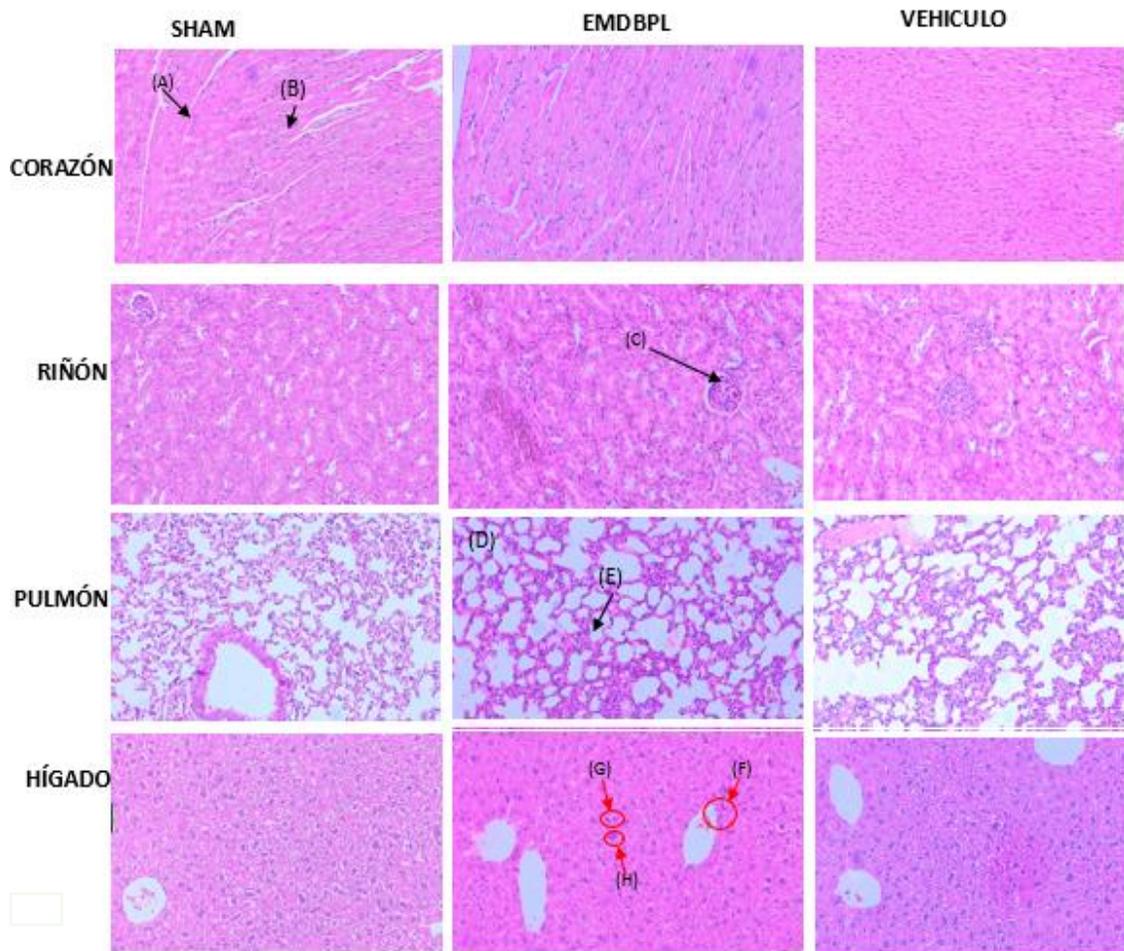


Figura 15 Cortes histológicos de los diferentes órganos aislados corazón, en donde se pueden observar las fibras musculares (A) que lo conforman, el riñón se puede observar un glomérulo (c), en el pulmón se observan los alveolos (D) y los septos alveolares (E)) se observa inflamación en la arteria hepática así como la pérdida de linfocitos cercanos a la vena porta (F), células binucleares (G) debido a la regeneración activa por una replicación celular, hepatocitos con núcleos grandes (H), necrosis activa mínima.

La especie *Prosthechea livida* no tiene antecedentes de estudios de toxicidad, sin embargo, en este trabajo se observó que no presenta un riesgo en diferentes dosis y no mostró mortalidad de los animales, con estos resultados se podría clasificar en la categoría 4 que podría ser tóxico bajo ciertas circunstancias, ya que se requieren más estudios para comprobar su seguridad, por esto se evaluó la toxicidad subaguda en donde no se encontró ningún cambio físico o de comportamiento y los animales tratados mantuvieron un peso constante durante los 28 días de administración del extracto DMBPL, sin embargo, se encontró una diferencia en el aumento de transaminasas, además de que en los pesos relativos de los órganos mostraron un aumento significativo en el hígado. Así mismo, en el análisis histopatológico se observaron cambios de lesiones hepatocelulares y regeneración activa mínimas. En este sentido, se puede decir que con un tratamiento de 28 días con el extracto DMBPL ocasiona un daño hepático mínimo a la dosis de 100 mg/kg.

8. CONCLUSIONES

- ❖ El extracto DMBPL en la curva de tolerancia a la glucosa presentó un efecto antihiper glucémico significativo en los tiempos 30 minutos, 1, 2 y 3 horas en comparación con el control tween 80 al 10%.
- ❖ El extracto DMBPL en la curva de tolerancia a la sacarosa presentó un efecto antihiper glucémico significativo en los tiempos de 0.5 y 1 h. en comparación con el control tween 80 al 10%, lo que sugiere que podría estar inhibiendo las enzimas α -glucosidasas encargadas de hidrolizar los carbohidratos adquiridos en la alimentación.
- ❖ El extracto DMBPL mostró un efecto vasorrelajante significativo independiente de la presencia de endotelio, el cual está relacionado con el bloqueo de canales de calcio de larga conductancia.
- ❖ El extracto DMBPL no presentó mortalidad de los individuos en las diferentes dosis (5, 25, 50, 300 y 2000 mg/kg), por lo tanto, se clasifica en la categoría 4 según la GHS, además de que, en la toxicidad subaguda, los individuos utilizados no mostraron una diferencia en los pesos durante los 28 días de administración, sin embargo, presenta niveles altos de ALT y AST, lo cual podría llegar a ocasionar hepatotoxicidad, pero en los cortes histológicos este daño es mínimo a nivel celular.
- ❖ En el fraccionamiento fitoquímico biodirigido, se evaluó el efecto vasorrelajante, teniendo un mayor efecto de la fracción 2 a 6, quienes presentaron un efecto independiente de la presencia de endotelio, la fracción 3 fue la más activa con un $93.53 \pm 3.2\%$ de relajación en presencia de endotelio y $79.39 \pm 3.5\%$ de relación en ausencia de endotelio.
- ❖ Se demostró a través de las pruebas colorimétricas que el contenido metabólico de el extracto DMBPL consta de fenoles, taninos, triterpenos, esteroides y posiblemente alcaloides.

9. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar la evaluación antidiabética subaguda y determinar el mecanismo de acción.
- ❖ Determinar la dosis efectiva media (DE_{50}) del efecto antihipertensivo de *prothechea livida*.
- ❖ Reproducir a la especie *prothechea livida* con el uso de la biotecnología para la producción a mayor escala de los compuestos responsables de los efectos farmacológicos.
- ❖ Elucidación estructural de los compuestos **1** y **2**.

10. REFERENCIAS

Adrián Humanes Copado y Ernesto Cogolludo Sánchez (2019). valoración de la intervención física y prevención de accidentes. Pazuela de Alarcón Madrid: Editex.

American Diabetes Association. (2020). Diabetes Care in the Hospital: Standards of Medical Care in Diabetes 2020. *Diabetes Care*, 43 (Supplement 1), S193-S202.

Anaya, C. O. M. y Ariza, I. D. S. (2005). Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(4), 235-243.

Araya-Orozco, M. (2004). Hipertensión arterial y diabetes mellitus. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 25(3-4), 65-71.

Ardoino, S. M., Boeris, M. A., y Toso, R. E. (2017). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Ciencia Veterinaria*, 15(1), 115-125.

Ayala, P., Calvo, C., Herrada, M., Fiallo, M. L., y Tezanos, R. (2002). Farmacología. -Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus. *Offarm: farmacia y sociedad*, 21(10), 120-124.

Barrera, C. A. C., Parra, J., y Suarez, L. E. C. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *Elementos*, 4(4), 31-39.

Bastarrachea, Laviada-Molina, Machado-Domínguez, Kent, López-Alvarenga, Y Comuzzie (2005). El receptor de insulina como objetivo farmacogenético: potenciando su señalización intracelular. *Revista de endocrinología y nutrición*, 13(4), 180-189.

Benito Calle, L. (2018). Efecto de aminoácidos dietéticos (Arginina) en la capacidad secretora de insulina de las células beta del páncreas. Implicaciones en la fisiopatología de la diabetes.

Bragulat, E. (2001). Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial: fármacos antihipertensivos. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*, 37(5), 215-221.

Bravo, J. J. M. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *SEMERGEN-Medicina de familia*, 27(3), 132-145.

Bravo, J. J. M. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *SEMERGEN-Medicina de familia*, 27(3), 132-145.

Burke, R. W., Diamondstone, B. I., Velapoldi, R. A., & Menis, O. (1974). Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(7), 794-801.

Castro, M. (2012). Regulación de la localización y función de los transportadores de glucosa de alta afinidad, Tesis licenciatura. Universidad Austral de Chile, facultad de ciencias, Valdivia Chile.

Cervantes-Villagrana, R. D., y Presno-Bernal, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(3), 98-106.

Céspedes Guzmán, M. D. C., y Estrada Cadena, P. J. (2019). *Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima alfa glucosidasa con extractos de hojas de guayaba (Psidium guajava L.)* (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).

Chawla, R. (2013). *Complicaciones de la diabetes* (Vol. 1). Santiago Auroch.

Chen, K., Li, G., Geng, F., Zhang, Z., Li, J., Yang, M., y Gao, F. (2014). Berberine reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via activating AMPK and PI3K–Akt signaling in diabetic rats. *Apoptosis*, 19(6), 946-957.

CONABIO, 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.

Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*, 55(5), 528-535.

Cotos Corro, N. E. (2020). Efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de las hojas de *Sida rhombifolia* L.(angulla) en la hiperglucemia inducida por aloxano en ratas.

del Olmo González, E., Pérez, M. C., y Gumpert, S. A. (2008). Actualización del tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 32(1), 1-16.

Díaz-Avilés J. N. 2018 Evaluación fitoquímica preliminar de dos especies de *Prosthechea* (Orchidaceae). Tesis Maestría Universidad Veracruzana facultad de ciencias biológicas y agropecuarias, Tuxpan Veracruz, México.

Rodríguez-Ocaña J.G. 2015 catalizadores ecológicos para la oxidación de compuestos orgánicos. Tesis ingeniero químico industrial, Instituto Politécnico Nacional, Escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, México D.F.

Estrada Soto S. (2000), “Estilbenos espasmolíticos de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*. Efecto del 3,4- didihidroxi-3,5 dimetoxibencilo sobre el sistema óxido nítrico / GMP cíclico”. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Estrada, S., Toscano, R. A., y Mata, R. (1999). New Phenanthrene Derivatives from *Maxillaria densa*. *Journal of natural products*, 62(8), 1175-1178.

Garrido, R. y Torres, M. 2008. Urgencias endocrinas: diabetes. *Asociación Española de Pediatría* (p.7).

Gil-Velázquez, L. E., Sil-Acosta, M. J., Domínguez-Sánchez, E. R., del Pilar Torres-Arreola, L., y Medina-Chávez, J. H. (2013). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista médica del instituto mexicano del seguro social*, 51(1), 1-16.

Gómez Huelgas, R., Díez-Espino, J., Formiga, F., Lafita Tejedor, J., Rodríguez Mañas, L., González-Sarmiento, E., y Sangrós, J. (2013). Tratamiento de la diabetes tipo 2 en el paciente anciano. *Medicina Clínica*, 140(3), 134-134.

Gómez Pinedo D. L. (2019). Determinación del efecto vasorrelajante de *Prosthechea livida* en un modelo *ex vivo* de aorta de rata. Tesis licenciatura, Cuernavaca, Morelos, México.

Gutiérrez, R. M. P., Gómez, Y. G. Y., y Ramírez, E. B. (2010). Nephroprotective activity of *Prosthechea michuacana* against cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Journal of medicinal food*, 13(4), 911-916.

Hall, J. E. (2015). *Guyton & Hall Physiology Review E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Iza Stoll, A. (2006). Tratamiento de la hipertensión arterial primaria. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 93-99.

Jabel Nolasco, F. W. (2018). Sinergismo del extracto acuoso *passiflora edulis* (maracuyá) y el *zea mays L.* (maíz morado) sobre la capacidad antioxidante.

Latha, L. Y., Sasidharan, S., Zuraini, Z., Suryani, S., Shirley, L., y Sangetha, S. 2007. Actividad antibacteriana y toxicidad de *Psophocarpus tetragonolobus*. *Biología farmacéutica* (p.36).

Legorreta, X. L. (1997). *Plantas, medicina y poder: breve historia de la herbolaria mexicana* (Vol. 5). Editorial Pax México.

Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Böhm, M., ... & Zannad, F. (2013). Guía de práctica clínica de la ESH/ESC para el manejo de la hipertensión arterial (2013). *Hipertensión y riesgo vascular*, 30, 4-91.

Mendoza, K., Márquez, R., Donado, A., Echenique, O., Mendoza, D. L., Pérez, M., y Macias, V. (2005). Fundamentos biomoleculares de la diabetes mellitus. *Duazary*, 2(2), 135-142

Mitchel, P., y Chéry, A. (2013). Manual de farmacología básica y clínica. McGraw Hill Education.

Oliva, S. T. (2003). Terapia génica para curar la diabetes. *Offarm: farmacia y sociedad*, 22(4), 116-124.

Pando-Alvarez, R. M. (2020). Sulfonilureas, su uso actual en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. *Diagnóstico*, 59(1), 16-22.

Perez, R. G., Anaya, I. S., Hoyo, C. V., y Victoria, T. C. (2011). Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharmaceutical biology*, 49(11), 1121-1127.

Rendón-Vallejo, P., Hernández-Abreu, O., Vergara-Galicia, J., Millán-Pacheco, C., Mejía, A., Ibarra-Barajas, M., y Estrada-Soto, S. (2012). Ex vivo study of the vasorelaxant activity induced by phenanthrene derivatives isolated from *Maxillaria densa*. *Journal of natural products*, 75(12), 2241-2245.

Reyes, J. A. O., y Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(1), 9-18.

Rubio-Guerra, A. F. (2018). Nuevas guías del American College of Cardiology/American Heart Association Hypertension para el tratamiento de la hipertensión. ¿Un salto en la dirección correcta? *Medicina interna de México*, 34(2), 299-303.

Tovar, E. G. (2020). Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos.

Valdés Ramos, E., y Bencosme Rodríguez, N. (2009). Frecuencia de la hipertensión arterial y su relación con algunas variables clínicas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Revista Cubana de endocrinología*, 20(3), 77-88.

Valle Rodríguez, A.d. (2006). Acoplamiento excitación-contracción en músculo liso: nuevo papel metabotrópico de los canales de calcio en la regulación del tono vascular. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.

Vergara-Galicia, J., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., y Estrada-Soto, S. 2013. Efecto vasorrelajante de *Laelia speciosa* y *Laelia anceps*: dos orquídeas como fuentes potenciales para el aislamiento de moléculas bioactivas. *Diario de la ciencia farmacéutica aplicada*, (p. 34).

Vergara-Galicia, J., Ortiz-Andrade, R., Castillo-España, P., Ibarra-Barajas, M., Gallardo-Ortiz, I., Villalobos-Molina, R., y Estrada-Soto, S. (2008). Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. *Vascular pharmacology*, 49(1), 26-31.

Vergara-Galicia, J., Ortiz-Andrade, R., Rivera-Leyva, J., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., y Estrada-Soto, S. (2010). Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. *Fitoterapia*, 81(5), 350-357.

Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., & Burnier, M. (2019). Guía ESC / ESH 2018 sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol*, 72(2), 160.

Zanoguera, C. G. (2012) La insulina y su señalización: mecanismos de transducción de la señal y efectos metabólicos, 12.

11. ANEXOS:

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
TUXPAN, VERACRUZ
HERBARIO VER-HER-223-07-09

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz. 23 de marzo de 2018

M en C. Oswaldo Javier Enciso Díaz
Presente.

Por este medio hago constar que se recibe un total de 4 especímenes, dos de la especie *Prostechea cochleata* (L) W. E. Higgins y dos de *P. livida* (L) W. E. Higgins, material que se entrega identificado, junto con la información de las etiquetas de los ejemplares.

El material recibido en el Herbario VER-HER-223-07-09 corresponde a 2 ejemplares con su duplicado (con hoja y flor) de los números de colecta del Mtro. Oswaldo Enciso y Josué Díaz: #OE-008, OE-009, quedando bajo resguardo.

Sin más por el momento.

Atentamente

Dra. Consuelo Domínguez Barradas

Responsable del Herbario

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



TUXPAN, VER