



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**PROPIEDADES MEDICINALES DE VITROPLANTAS Y PLANTAS SILVESTRES DE
STANHOPEA TIGRINA (ORCHIDACEAE)**

PRESENTA:

M.C. ROCÍO DEL CARMEN DÍAZ TORRES

CODIRECTORES DE TESIS:

DRA. CANDY CARRANZA ALVAREZ

DR. ANGEL JOSABAD ALONSO CASTRO

ASESORES:

DRA. BERTHA IRENE JUAREZ FLORES

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

**Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Estudios
Profesionales Zona Huasteca.**

**Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas,
Universidad de Guanajuato.**

CON FINANCIAMIENTO DE:

**Infraestructura CONACyT 2094y FAI2020 otorgado a Candy Carranza Álvarez
Convocatoria “Ciencia Básica y de Frontera 2023-2024 de CONAHCYT (CBF2023-2024-
1888) otorgado a Angel Josabad Alonso Castro**

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**PROPIEDADES MEDICINALES DE VITROPLANTAS Y PLANTAS SILVESTRES DE
STANHOPEA TIGRINA (ORCHIDACEAE).**

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 332455

**EL POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS DEL
PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC).**



PROPIEDADES MEDICINALES DE VITROPLANTAS Y PLANTAS SILVESTRES DE *STANHOPEA TIGRINA* (ORCHIDACEAE) by ROCÍO DEL CARMEN DÍAZ TORRES is licensed under a [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

DEDICATORIA

A mi querido esposo Ángel y amado hijo Abdú

Este logro no solo es el resultado de mi esfuerzo individual, sino también el fruto del amor, apoyo y comprensión incondicional que ustedes me han brindado a lo largo de este tiempo.

A mi esposo, mi compañero de vida, este logro es el resultado de un viaje que hemos compartido juntos, lleno de apoyo mutuo, comprensión y amor, te agradezco por tu paciencia infinita, tu apoyo y tu amor constante. Tu fe en mí ha sido mi mayor motivación y fuerza impulsora para alcanzar este hito.

A mi hijo, mi fuente inagotable de alegría e inspiración, mi mayor motivo para esforzarme cada día, te agradezco por tu comprensión y por ser mi recordatorio diario de lo que realmente importa en la vida.

Cada página de esta tesis lleva impreso el amor y la gratitud que siento por ustedes dos. Este logro es también de ustedes, porque cada paso del camino lo hemos recorrido juntos, como una familia unida. Gracias por ser mi mayor fuente de inspiración y motivación y por hacer que este viaje valga la pena.

¡Los amo más de lo que las palabras pueden expresar!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Dios, fuente de toda sabiduría y fortaleza, por haberme guiado y sostenido a lo largo de este arduo pero gratificante viaje académico.

A mi familia, Ángel y Abdú por su apoyo incondicional y su constante motivación durante todo este proceso.

A la Dra. Candy Carranza Álvarez, por su apoyo, su paciencia y por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, por proporcionar el espacio, recursos y conocimientos para llevar cabo este proyecto.

A la Dra. Bertha Irene Juárez Flores, por su orientación experta, su paciencia y sus valiosas sugerencias que han enriquecido este trabajo.

A mi compañero de vida, el M.C. José Ángel Montes Rocha por su apoyo en la parte experimental, por las sugerencias, ánimo y comprensión en los momentos más difíciles.

A la M.C. Claudia E. Moctezuma Granados por su apoyo en la parte técnica de este proyecto.

A los habitantes de Barrio de Joljá, Tampaxal, por proporcionarme información y accesibilidad con la colecta de los ejemplares silvestres de *S. tigrina*.

Al Dr. Eleazar Carranza González por su participación en la identificación taxonómica de los ejemplares silvestres en el Herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP.

A todos los participantes que generosamente compartieron su tiempo y conocimientos para este proyecto de investigación.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Justificación	3
1.2	Hipótesis	3
1.3	Objetivos	4
1.3.1	Objetivo general	4
1.3.2	Objetivos específicos	4
II.	ANTECEDENTES	5
2.1	Medicina tradicional	5
2.2	Orquídeas en la medicina tradicional.....	7
2.3	Toxicidad	13
2.4	Metabolitos secundarios en orquídeas medicinales	13
2.5	Orquídeas en México	14
2.5.1	Stanhopeas en México	15
2.5.2	<i>Stanhopea tigrina</i>	16
2.6	Cultivo tejido vegetal (CTV) <i>in vitro</i>	18
2.7	Trastornos de ansiedad y crisis nerviosas	22
2.7.1	Fármacos ansiolíticos, mecanismo de acción y efectos secundarios.....	23
2.7.2	Medicina tradicional mexicana para la ansiedad.....	25
2.8	Trastornos renales urológicos	30
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1	Estudio etnobotánico.....	34
3.2	Material vegetal	34
3.2.1	Recolecta <i>in situ</i> de <i>S. tigrina</i>	34

3.2.2	Resiembra de vitroplantas de <i>S. tigrina</i>	35
3.2.3	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>S. tigrina</i>	36
3.3	Obtención de los extractos	37
3.4	Tamizaje fitoquímico cualitativo	38
3.4.1	Determinación de alcaloides.....	39
3.4.2	Determinación de terpenos	40
3.4.3	Determinación de esteroides.....	40
3.4.4	Determinación de sesquiterpenlactonas.....	40
3.4.5	Determinación de cumarinas	41
3.4.6	Determinación de Flavonoides	41
3.4.7	Determinación de flavonoles, flavonas, chalconas y quinonas	41
3.4.8	Determinación de oxhidrilos fenólicos.....	41
3.4.9	Determinación de insaturaciones.....	42
3.4.10	Determinación de Saponinas	42
3.4.11	Determinación de glucósidos cardiacos	42
3.5	Ensayos para determinar capacidad antioxidante de los extractos de <i>S. tigrina</i>	42
3.5.1	Método ABTS (ácido 2,2ázinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	42
3.5.2	Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	44
3.5.3	Interpretación de resultados ABTS y DPPH	45
3.6	Ensayos para determinar el contenido de polifenoles totales y flavonoides de los extractos de <i>S. tigrina</i>	46
3.6.1	Ensayo de Folin-Ciocalteu para Contenido Fenólico Total (CFT)	46
3.6.2	Ensayo de tricloruro de aluminio (AlCl ₃) para flavonoides totales.....	48
3.7	Biomodelo de experimentación para las pruebas farmacológicas: actividad ansiolítica, locomotora, hipnótica, sedante y efecto diurético de <i>S. tigrina</i>	49

3.8	Evaluación de toxicidad aguda DL ₅₀	49
3.9	Ensayos neurofarmacológicos para determinar la actividad ansiolítica, locomotora, hipnótica y sedante en extractos de <i>S. tigrina</i>	49
3.9.1	Actividad de tipo ansiolítica	51
3.9.2	Actividad y coordinación motora	53
3.9.3	Actividad hipnótica y sedante	53
3.10	Ensayo para medir el efecto diurético de los extractos obtenidos de <i>S. tigrina</i>	54
3.10.1	Mecanismo de acción para el efecto diurético.....	55
3.9	Análisis estadístico	56
IV.	RESULTADOS	57
4.1	Estudio etnobotánico	57
4.1		59
4.1.1	Recolecta <i>in situ</i> de <i>S. tigrina</i> silvestre.....	59
4.1.2	Resiembra de vitroplantas de <i>S. tigrina</i>	60
4.2	Tamizaje fitoquímico cualitativo	62
4.3	Ensayos para determinar capacidad antioxidante de los extractos de <i>S. tigrina</i>	63
4.3.1	Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por ABTS.....	63
4.3.2	Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por DPPH.....	64
4.4	Ensayos para determinar el contenido de polifenoles totales y flavonoides de los extractos de <i>S. tigrina</i>	66
4.4.1	Cuantificación del Contenido Fenólico Total (CFT).....	66
4.4.2	Cuantificación de flavonoides totales.....	66
4.4.3	Correlación entre actividad antioxidante con polifenoles y flavonoides.....	67
4.5	Evaluación de toxicidad aguda DL ₅₀	70

4.6	Actividad ansiolítica, locomotora, hipnótica y sedante de los extractos de <i>S. tigrina</i>	70
4.6.1	Ensayo de cilindro exploratorio.....	70
4.6.2	Ensayo de caja/tablero de hoyos.....	71
4.6.3	Mecanismo de acción del modelo de ansiedad.....	73
4.6.4	Prueba de rotarod.....	73
4.6.5	Prueba de sueño inducida por pentobarbital.....	74
4.7	Efecto diurético de los extractos de <i>S. tigrina</i>	75
4.7.1	Mecanismo de acción del modelo de ansiedad.....	77
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
VI.	CONCLUSIONES	84
VII.	PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	85
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO I.	Estudio etnobotánico para <i>S. tigrina</i>	101
ANEXO II.	Datos de colecta <i>in situ</i>	102
ANEXO III.	Curva de calibración para ABTS.....	103
ANEXO IV.	Curva de calibración para DPPH	105
ANEXO V.	Curva de calibración para Contenido Fenólico Total (CFT).....	107
ANEXO VI.	Curva de calibración para Contenido de flavonoides	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Stanhopea tigrina</i> en México (CONABIO, 2007).	16
Figura 2. <i>Stanhopea tigrina</i> (Eng-Soon, 2019)	17
Figura 3. Proceso del cultivo de tejido vegetal (CTV) <i>in vitro</i>	19
Figura 4. Sitio de colecta de los ejemplares de <i>S. tigrina</i>	35
Figura 5. Diseño experimental de la resiembra de vitroplantas de <i>S. tigrina</i>	36
Figura 6. Esquema de los procesos de extracción para <i>S. tigrina</i>	37
Figura 7. Determinaciones fitoquímicas cualitativas de los extractos de <i>S. tigrina</i>	39
Figura 8. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS	43
Figura 9. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH	44
Figura 10. Proceso de cuantificación del CFT en extractos de <i>S. tigrina</i>	47
Figura 11. Proceso de cuantificación de flavonoides en extractos de <i>S. tigrina</i>	48
Figura 12. Modelo experimental para los ensayos neurofarmacológicos.	50
Figura 13. Mecanismo de acción de la actividad ansiolítica.	53
Figura 14. Modelo experimental para la evaluación del efecto diurético.	55
Figura 15. Mecanismo de acción del efecto diurético.	56
Figura 16. Estudio etnobotánico sobre el uso de <i>S. tigrina</i> como planta medicinal.....	58
Figura 17. Estudio etnobotánico: usos o fines mágico-religiosos de <i>S. tigrina</i> por municipio.	59
Figura 18. <i>Stanhopea tigrina in situ</i>	60
Figura 19. Crecimiento de las resiembras de vitroplantas de <i>S. tigrina</i>	60
Figura 20. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> ABTS en extractos de <i>S. tigrina</i>	63
Figura 21. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> DPPH en extractos de <i>S. tigrina</i>	65
Figura 22. Contenido de polifenoles totales en extractos de <i>S. tigrina</i>	66
Figura 23. Contenido de flavonoides en extractos de <i>S. tigrina</i>	67
Figura 24. Correlación de Pearson entre ABTS y CFT.....	68
Figura 25. Correlación de Pearson entre ABTS y flavonoides.....	68
Figura 26. Correlación de Pearson entre DPPH) y CFT.....	69
Figura 27. Correlación de Pearson entre DPPH y flavonoides.....	69
Figura 28. Cilindro exploratorio con los tratamientos de <i>S. tigrina</i>	70

Figura 29. Curvas dosis-respuesta DE ₅₀ para efecto ansiolítico por el ensayo cilindro exploratorio.....	71
Figura 30. Tablero de hoyos con los tratamientos de <i>S. tigrina</i>	72
Figura 31. Curvas dosis-respuesta DE ₅₀ para efecto ansiolítico por el ensayo caja de hoyo.	72
Figura 32. Posible mecanismo de acción del HE en el ensayo del tablero perforado.	73
Figura 33. Rotarod test con extracto de <i>S. tigrina</i> a los 60 y 120 min.	74
Figura 34. Prueba de sueño inducida por pentobarbital con los extractos de <i>S. tigrina</i>	75
Figura 35. Efecto diurético de los tratamientos del extracto HE de <i>S. tigrina</i>	76
Figura 36. Curvas dosis-respuesta DE ₅₀ para efecto diurético.	77
Figura 37. Posible mecanismo de acción del efecto diurético de HE.....	77
Figura 38. Curva de calibración de ácido ascórbico por el método ABTS.	104
Figura 39. Curva de calibración de ácido ascórbico para el método DPPH.....	106
Figura 40. Curva de calibración para el CFT.	108
Figura 41. Curva de calibración para flavonoides.	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Orquídeas medicinales epifitas, usos etnomedicinales y estudios farmacológicos.	8
Tabla 2. Propagación de orquídeas a través de CTV para su conservación.	20
Tabla 3. Estudios preclínicos de algunas plantas medicinales utilizadas para trastornos de ansiedad en México.	26
Tabla 4. Algunas plantas medicinales con efectos farmacológicos renales urológicos.....	30
Tabla 5. Resiembra de vitroplantas de <i>S. tigrina</i> por lote.....	61
Tabla 6. Contaminación en las resiembras de vitroplantas de <i>S. tigrina</i>	61
Tabla 7. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos etanólico y acuoso de <i>S. tigrina</i>	62
Tabla 8. Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) y porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa (%AAR) mediante ABTS de los extractos de <i>S. tigrina</i>	64
Tabla 9. Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) y porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa (%AAR) mediante DPPH de los extractos de <i>S. tigrina</i>	65

RESUMEN

Stanhopea tigrina Bateman ex Lindl. (Orchidaceae), conocida como "orquídea calavera" en la Huasteca Potosina, "vaquita" en Veracruz y "torito" en Puebla, es una orquídea endémica de México. Este estudio etnobotánico y etnomedicinal es el primero en reportar los usos terapéuticos de *S. tigrina* en la Huasteca Potosina, una región habitada por las etnias Náhuatl, Tenek y Pame. Los resultados indican que *S. tigrina* se utiliza tradicionalmente para tratar trastornos mentales y urológicos, con un índice de uso tradicional (UST) del 32%, lo que refleja una significativa aceptación cultural y sugiere su potencial para validación científica. Para este estudio, se obtuvieron extractos acuosos de hojas (HA) y pseudobulbos (PA) mediante decocción, y extractos etanólicos de hojas (HE), pseudobulbos (PE) y plántulas *in vitro* (IE) mediante extracción asistida por microondas (MAE). Los extractos se sometieron a un tamiz fitoquímico cualitativo y se evaluaron sus actividades antioxidantes, contenido fenólico total (CFT), contenido de flavonoides, y actividades ansiolítica, locomotora, hipnótica, sedante y diurética.

El extracto etanólico de hojas (HE) mostró la mayor capacidad antioxidante, con valores ABTS (CI_{50} = 3.53 mg/mL) y DPPH (CI_{50} = 0.39 mg/mL). Además, HE a 50 y 100 mg/kg reveló actividad ansiolítica (DE_{50} = 11.52 mg/kg) sin inducir hipnosis o sedación, y efecto diurético (DE_{50} = 39.47 mg/kg). La actividad ansiolítica de HE se revirtió con flumazenil, prazosina y ketanserina, sugiriendo la participación de los sistemas GABAérgico, adrenérgico (receptores $\alpha 1$ -AR) y serotoninérgico (receptores 5-HT_{2A}), respectivamente. El efecto diurético fue revertido por L-NAME, un inhibidor no selectivo de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), indicando la participación del óxido nítrico (NO).

Los resultados validan el uso de *S. tigrina* en la medicina tradicional de la Huasteca Potosina, demostrando que el extracto etanólico de hojas exhibe actividades antioxidante, ansiolítica y diurética sin inducir hipnosis ni sedación.

Palabras clave: Actividad ansiolítica, efecto diurético, capacidad antioxidante, sistema GABA, receptor $\alpha 1$ -AR, receptor 5-HT₂ y óxido nítrico sintasa (NOS).

ABSTRACT

Stanhopea tigrina (Orchidaceae), known as "orquídea calavera" in Huasteca Potosina, "vaquita" in Veracruz and "torito" in Puebla, is an orchid endemic to Mexico. This is the first ethnobotanical and ethnomedicinal study to report the therapeutic uses of *S. tigrina* in the Huasteca Potosina, a region inhabited by the Nahuatl, Tenek, and Pame ethnic groups. The results indicate that *S. tigrina* is traditionally used to treat urological mental and renal disorders, with a traditional use rate (UST) of 32%, reflecting significant cultural acceptance and suggesting its potential for scientific validation. For this study, aqueous extracts of leaves (HA) and pseudobulbs (PA) were obtained by decoction, and ethanolic extracts of leaves (HE), pseudobulbs (PE), and *in vitro* seedlings (IE) were obtained by microwave-assisted extraction (MAE). The extracts were subjected to a qualitative phytochemical screening, and their antioxidant activities, total phenolic content (CFT), flavonoid content, and anxiolytic, locomotor, hypnotic, sedative, and diuretic activities were evaluated.

The ethanolic extract of leaves (HE) showed the highest antioxidant capacity, with ABTS ($CI_{50} = 3.53$ mg/mL) and DPPH ($CI_{50} = 0.39$ mg/mL) values. Furthermore, HE at 50 and 100 mg/kg revealed anxiolytic activity ($ED_{50} = 11.52$ mg/kg) without inducing hypnosis or sedation, and a diuretic effect ($ED_{50} = 39.47$ mg/kg). The anxiolytic activity of HE was reversed by flumazenil, prazosin, and ketanserin, suggesting the participation of the GABAergic, adrenergic ($\alpha 1$ -AR receptors) and serotonergic (5-HT₂ receptors) systems, respectively. The diuretic effect was reversed by L-NAME, a non-selective inhibitor of the enzyme nitric oxide synthase (NOS), indicating the participation of nitric oxide (NO).

The results validate the use of *S. tigrina* in traditional medicine of the Huasteca Potosina, demonstrating that the ethanolic extract of leaves exhibits antioxidant, anxiolytic, and diuretic activities without inducing hypnosis or sedation.

Keywords: Anxiolytic activity, diuretic effect, antioxidant capacity, GABA system, $\alpha 1$ -AR receptor, 5-HT₂ receptor and nitric oxide synthase (NOS).

I. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más diversas del reino vegetal, con aproximadamente 30,000 especies silvestres conocidas y cerca de 100,000 híbridos a nivel mundial (Fonmboh *et al.*, 2021). Su valor comercial y hortícola, junto con sus usos etnobotánicos, han despertado el interés humano durante siglos (Salazar-Cerezo, 2018). Aunque las orquídeas se distribuyen en casi todos los continentes, su mayor diversidad se encuentra en las regiones tropicales (Hágsater *et al.*, 2005).

A lo largo de la historia, diversas culturas han utilizado las orquídeas en la medicina tradicional. Los chinos fueron los primeros en cultivarlas, alrededor del año 500 a.C. Más tarde, en el siglo V, los griegos también las emplearon como plantas medicinales. En América, los aztecas utilizaban las orquídeas no solo como plantas medicinales, sino también como especias, alimentos y ornamentales. Actualmente, muchas comunidades indígenas en México siguen utilizando diversas especies de orquídeas, apreciando tanto su valor estético como sus propiedades medicinales (Tellez-Velazco, 2011). El uso de plantas medicinales es una práctica fundamental en la cosmovisión de los pueblos indígenas, lo que representa un conocimiento milenario que fortalece y preserva su identidad (Jiménez-Silva, 2017).

Se consideran como plantas medicinales aquellas que contienen en uno o más de sus órganos, sustancias o compuestos químicos, productos del metabolismo secundario, que al interactuar con el organismo humano pueden producir un efecto terapéutico (Vázquez y Quintana, 2008). Según la Organización Mundial de la Salud (2020), la actividad terapéutica de una planta medicinal incluye la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades físicas y mentales, el alivio de síntomas y la regulación beneficiosa del estado físico y mental del organismo. Los componentes responsables de la actividad terapéutica en una planta son los principios activos, que son en su mayoría metabolitos secundarios distribuidos de manera regular en el reino vegetal (Da-cheng & Pei-gen, 2020). Las plantas sintetizan y acumulan estos metabolitos como parte de su defensa química contra el estrés biótico y abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Actualmente, muchas especies vegetales están en peligro de extinción o se han extinguido debido a problemas ambientales provocados por el hombre y a la sobreexplotación de fuentes naturales (Makunga y van Staden, 2008). Esto hace que el

estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea un gran desafío, requiriendo diversas tecnologías para su producción, caracterización e identificación (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). La producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares es una alternativa atractiva frente a su extracción de plantas silvestres y su síntesis química (Rojas-Idrogo *et al.*, 2014). Sin embargo, aún faltan estudios químicos, clínicos, epidemiológicos y toxicológicos que confirmen los efectos de muchas plantas y los principios activos responsables (Bermúdez *et al.*, 2002). Se estima que alrededor del 5% de las 4000 especies de plantas mexicanas con propiedades medicinales han sido validadas química, farmacológica y biomédicamente (Dorado-Martínez, 2020).

En este contexto, el cultivo de tejido vegetal *in vitro* es una alternativa para la producción de metabolitos secundarios de gran interés sin afectar las poblaciones naturales de las plantas (Vanisree y Tsay, 2007). Además, esta técnica tiene un amplio uso en el mejoramiento genético de plantas, la obtención de clones libres de microorganismos patógenos y contaminantes, y la conservación de germoplasma (Perez-Alonso y Jiménez, 2011). El cultivo de tejido vegetal *in vitro* es una herramienta biotecnológica útil para producir grandes cantidades de plantas en un tiempo relativamente corto, con calidad uniforme y rendimiento independiente de las variaciones geográficas, estacionales y ambientales, sin el uso de pesticidas y/o herbicidas (Rao *et al.*, 2002; Debnath *et al.*, 2006; Bonfill *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en este estudio se estandarizarán las condiciones de crecimiento *in vitro* de *S. tigrina* para garantizar la producción de material vegetal sin afectar las poblaciones silvestres de esta orquídea. Este sistema *in vitro* servirá como modelo para estudiar las propiedades medicinales de la orquídea en condiciones controladas, permitiendo comparar los resultados con las especies silvestres. El estudio de sus propiedades farmacológicas generará información sobre las propiedades medicinales de esta orquídea, estableciendo un sistema productor de compuestos bioactivos a través del cultivo *in vitro* y preservando el conocimiento tradicional sobre sus usos en la Huasteca Potosina.

1.1 Justificación

Desde tiempos antiguos el ser humano ha tratado de mitigar el dolor, y prolongar su vida con plantas que presentaban efectos terapéuticos. Cada región del mundo desarrolló una forma única y característica de curar a partir de plantas medicinales, puesto que se utilizaban especies endémicas. Con el tiempo, estas terapias locales conformaron la llamada medicina tradicional, la cual es la suma de conocimientos, tradiciones y creencias de una cultura, para mantener la salud o tratar la enfermedad. Hasta la actualidad, se han registrado entre 4,000 y 4,500 especies vegetales con potencial terapéutico, de las cuales un bajo porcentaje cuenta con una validación farmacológica basada en evidencia científica. Dentro de esta diversidad vegetal se encuentra la familia *Orchidaceae*, de la cual algunas especies son utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas. Sin embargo, se carece de información científica que confirme los efectos de los principios activos responsables. *S. trigrina*, orquídea de interés para este estudio, es una especie que se utiliza en la Huasteca Potosina por su valor ornamental y medicinal, lo que ha ocasionado que esta especie se encuentre en estado de amenaza. Además, no existen reportes científicos que validen los usos medicinales que se le atribuyen. Por ello, es necesario primero resguardar la información tradicional sobre sus propiedades medicinales, y después validarla científicamente. Además, de proponer nuevas alternativas para la producción de metabolitos secundarios de interés en la medicina tradicional sin comprometer la existencia de las poblaciones naturales.

1.2 Hipótesis

Los extractos vegetales de *S. tigrina* silvestre presentan actividad ansiolítica y efecto diurético, y estas propiedades medicinales también se encuentran presentes en extractos vegetales obtenidos a partir del cultivo *in vitro*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Estudiar las propiedades medicinales atribuidas a *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae) en material producido bajo condiciones *in vitro* y en plantas silvestres.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Conocer los usos medicinales atribuidos a *S. tigrina* en la Huasteca Potosina.
2. Establecer el cultivo *in vitro* de *S. tigrina* para generar la propagación masiva de plántulas.
3. Determinar la capacidad antioxidante en extractos del material vegetal producido *in vitro* y en plantas silvestres.
4. Evaluar el efecto ansiolítico, sedante y diurético en los extractos de *S. tigrina* (vitroplanta y silvestre).
5. Determinar la dosis letal media (DL₅₀) de *S. tigrina* que hayan presentado mayor actividad biológica.
6. Realizar una propuesta integral para garantizar la producción de metabolitos sin afectar las poblaciones silvestres.

II. ANTECEDENTES

2.1 Medicina tradicional

En cada región del mundo se han identificado distintas formas de atender los problemas de salud, de acuerdo con las creencias, ideologías y costumbres; cada cultura desarrolló una forma única del uso medicinal de la flora y fauna, apropiándose de la riqueza biológica que ofrecen los ecosistemas en los que habitan (Jiménez-Silva, 2017); es decir, los recursos vegetales son considerados producto de la cultura (Jiménez-Cabrera *et al.*, 2015).

El planeta alberga una diversidad de 391,000 plantas vasculares, de las cuales al menos, 35,000 especies presentan potencial para uso medicinal, por ello, el uso de plantas medicinales ha sido una práctica tradicional que no ha caído en desuso. En este contexto, es importante mencionar que cerca del 25% de los compuestos bioactivos utilizados en diversos medicamentos provienen de las plantas y que 80% de la población mundial depende de remedios herbolarios tradicionales (García de Alba-García *et al.*, 2012; Kew, 2016).

La República Mexicana posee una gran riqueza biológica debida a la considerable extensión de zona subtropical, por lo que tiene una de las floras más variadas de América. Dentro de esta diversidad vegetal existen más de 30,000 especies de plantas vasculares, de las cuales se calcula que al menos el 50% se utiliza para satisfacer alguna necesidad humana y las plantas medicinales ocupan el principal porcentaje (Ghenó *et al.*, 2011).

El conocimiento de la medicina tradicional procede de una gran variedad de fuentes de conocimiento, desde la transmisión oral a través de relatos, mitos y rituales hasta los registros históricos de preservación de saberes y prácticas escritas en códices, manuscritos ilustrados y libros (Gubler, 1996). México cuenta con una riqueza milenaria en el conocimiento de plantas medicinales, los antiguos pobladores de nuestro territorio, aztecas, mayas y zapotecas cultivaron un profundo entendimiento de la flora local y sus propiedades curativas desarrollando una de las herbolarias más complejas del mundo, dan cuenta de ello con amplitud el “Códice De la Cruz-Badiano” escrito en náhuatl y latín (Martín De la Cruz), el “Códice Florentino” (Bernardino de Sahagún), la obra “Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales” (Nicolás Monardes), la “Historia Natural de la Nueva España” (Francisco Hernández) (Sharma *et al.*, 2017; Miranda-Limón, 2020).

De la época colonial surgieron los libros de Chilam Balam, el Libro del Judío y el Libro de medicinas, que contienen una mezcla única de conocimientos prehispánicos y prácticas médicas europeas (Gubler, 1996). También se encuentran las obras “Historia natural de la provincia de San Vicente de Chiapas y Guatemala” (Francisco Ximénes), el “Florilegio Medicinal” (Juan de Esteyneffer), “Medicina doméstica o descripción de los nombres y virtudes de las yerbas indígenas de Yucatán y las enfermedades a que se aplican” (Ricardo Ossado) y la “Historia Antigua de México” (Fco. Javier Clavijero). Del siglo XX destacan las obras “Apuntes para la geografía botánica de México” (Alfonso Herrera) y el “Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana” resultado de un esfuerzo colaborativo entre el Instituto Nacional Indigenista (INI), el Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH), y la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), entre otros. En esta época se fundó la “Sociedad Botánica de México” por Paul Stanley y Maximino Martínez, así como también el “Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAN)” por Narciso Souza, R. Schultes, A. Hofmann, José Luis Díaz y Xavier Lozoya (Dorado-Martínez, 2020).

La documentación escrita ha desempeñado un papel importante en la conservación y transmisión del conocimiento sobre las plantas medicinales, sin embargo, actualmente la tradición de transmitir el conocimiento de forma oral sobre las plantas medicinales es fundamental en muchas comunidades, en la Región Totonaca el uso de la medicina tradicional continúa siendo un elemento central en la preservación de la salud en el hogar y es en la familia nuclear donde primordialmente los padres se ocupan de enseñar a los hijos la forma de preparar los remedios caseros herbolarios, considerando los ciclos productivos de las plantas, intensidades de manejo y de las técnicas de colecta en función a la capacidad de regeneración de los recursos fitogenéticos de que disponen (Orozco, 2010; Jiménez-Cabrera *et al.*, 2015). De igual forma, para los habitantes de las comunidades indígenas de la Huasteca Potosina el uso de plantas medicinales ha sido transmitido de forma oral a sus descendientes y por lo tanto no existen informes sobre sus usos etnomedicinales; sin embargo, el conocimiento tradicional sobre plantas medicinales sigue vigente (Puig, 1991).

En nuestro país las plantas medicinales y su potencial terapéutico solo están parcialmente explorados; por lo cual se requiere de la ampliación, profundización y aplicación de estudios etnofarmacológicos, que permitan explorar el conocimiento tradicional

de las comunidades indígenas con la ciencia moderna para descubrir y desarrollar nuevos tratamientos y medicamentos basados en plantas (Luna-Nemecio, 2019).

La etnofarmacología es una ciencia multidisciplinaria y se considera como el estudio científico del uso tradicional de plantas y otros organismos con fines medicinales; involucra la recopilación y documentación del conocimiento tradicional, las observaciones en campo, descripción del uso y preparación de los remedios, la recolección de plantas medicinales, la determinación botánica del material obtenido, estudios fitoquímicos para aislar los compuestos bioactivos presentes en las plantas, así como los estudios farmacológicos, para comprobar las propiedades curativas otorgadas de manera empírica por los pueblos originarios (Dorado-Martínez, 2020).

Los estudios etnofarmacológicos son cruciales para entender las propiedades medicinales de las plantas, identificar compuestos activos, evaluar su seguridad y eficacia, permite descubrir nuevos medicamentos, comprender los mecanismos de acción de las plantas medicinales, contribuyen al uso seguro de los medicamentos basados en plantas medicinales y a la identificación de patrones para el desarrollo de nuevos fármacos (Da-cheng & Pei-gen, 2020).

La etnofarmacología no solo tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos, sino también para la conservación de la biodiversidad y el fortalecimiento de las prácticas culturales tradicionales, lo que puede contribuir a la preservación de las culturas y lograr un desarrollo social sostenible (Luna-Nemecio, 2020). Pues al conocer las propiedades farmacológicas de los compuestos activos se podrán ofrecer terapias alternativas económicas, accesibles, con menos efectos adversos y sobre todo propias de la cultura (Dorado-Martínez, 2020).

2.2 Orquídeas en la medicina tradicional

El uso de orquídeas medicinales está extendido por todo el mundo, sin embargo, se encuentra poca información para el continente americano en cuanto al número de especies y antecedentes culturales (Cano-Asseleih *et al.*, 2015).

Nugraha (2020), en su revisión bibliográfica sobre plantas medicinales vasculares epífitas (Tabla 1) mencionó algunas especies de la familia *Orchidaceae*, cubriendo los usos etnomedicinales, estudios fitoquímicos y actividades farmacológicas.

Tabla 1. *Orquídeas medicinales epifitas, usos etnomedicinales y estudios farmacológicos.*

Orquídeas epifitas	Ubicación	Parte de la planta	Elaboración	Uso tradicional	Pruebas farmacológicas	Referencias
<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata	Taiwan	Entera	Decocción	Fiebre, antiinflamatorio, diabetes, trastornos hepáticos, dolor torácico y abdominal.	Antiinflamatorio Hepatoprotector Antihiperglucémico Antioxidante Anticancerígeno	Nugraha, 2020
<i>Anoectochilus roxburghii</i> (Wall.) Lindl.	Taiwán, China, Japón	Entera	Decocción	Fiebre, mordedura de serpiente, enfermedades pulmonares y hepáticas, hipertensión, desnutrición infantil	Efectos hipoglucémicos y antioxidantes	Nugraha, 2020
<i>Bulbophyllum kwangtungense</i> Schltr.	China, Japón	Entera	Tónico	Para tratar la tuberculosis pulmonar, promover la producción de líquidos corporales, reducir la fiebre, agente hemostático	Actividad antitumoral	Nugraha, 2020

<i>Bulbophyllum odoratissimum</i> (S m.) Lindl. ex Wall.	China, Birmania, Vietnam, Tailandia, Laos, Nepal, Bután, India	Entera	Decocción	Para tratar la tuberculosis pulmonar, la inflamación crónica y las fracturas	Actividad antitumoral Anticancerígeno	Nugraha, 2020
<i>Catasetum barbatum</i> (Lindl.) Lindl.	Japón, Guayana, Paraguay	Entera	Decocción	Febrífugo y antiinflamatorio	Antiinflamatorio	Nugraha, 2020
<i>Cymbidium aloifolium</i> (L.) Sw.	Tailandia, Vietnam	Hoja	Decocción (interna), jugo de hojas calientes o trituradas.	Otitis media, resfriados, períodos irregulares, artritis, llagas, quemaduras, tónico	Antinociceptivo, antiinflamatorio	Nugraha, 2020
<i>Cymbidium goeringii</i> (Rchb.f.) Rchb.f.	Japón, China, Corea, Tailandia, Vietnam, India	Entera	Decocción	Hipertensión, agente diurético	Antiinflamatorio Antihipertensivo Actividad diurética	Nugraha, 2020
<i>Dendrobium amoenum</i> Wall. ex Lindl.	China	Hoja	Seco y molido	Enfermedades de la piel	Antioxidante Antibacteriano	Nugraha, 2020
<i>Dendrobium chryseum</i> Rolfe	Australia	Hoja	Decocción	Diabetes	Antioxidante	Nugraha, 2020
<i>Dendrobium candidum</i> . ex Lindl.	China	Hoja	Decocción	Diabetes	Antihiper glucémico Antioxidante Antitumoral	Nugraha, 2020

<i>Dendrobium crumenatum</i> Sw.	Malasia, Indonesia	Hoja Tubérculo	Hojas machacadas, bulbos calentados para producir jugo y aplicados como usos externo	Acné (hojas)	Antimicrobiano	Nugraha, 2020
<i>Dendrobium chrysanthum</i> Lindl.	China	Hoja	Seco y molido	Enfermedades de la piel y antipirético.	Antiinflamatorio	Nugraha, 2020
<i>Epidendrum strobiliferum</i> Rchb.f.	China, Corea	Vapor	Infusión Decocción	Analgesico	Analgesico	Nugraha, 2020
<i>Neottia ovata</i> (L.) Bluff y Fingerh.	España	Tubérculo	Tintura	Enfermedades estomacales	Antivirico	Nugraha, 2020
<i>Camaridium densum</i> (Lindl.)	México	Entera	Decocción	Agentes analgésicos, relajantes	Actividad Espasmolítica Antinociceptiva	Nugraha, 2020
<i>Nidema boothii</i> (Lindl.) Schltr.	Malasia	Entera	Decocción	Agente relajante	Espasmolítico	Nugraha, 2020
<i>Pholidota chinensis</i> Lindl.	China India	Pseudobulbo	Tintura	Escrófula, dolor de muelas, dolor de estómago, bronquitis crónica, úlcera duodenal	Antioxidante Antiinflamatorio	Nugraha, 2020
<i>Scaphyglottis livida</i> (Lindl.) Schltr.	México	Entera	Decocción	Agentes analgésicos y antiinflamatorios	Espasmolítico Antinociceptivo	Nugraha, 2020

<i>Vanda tessellata</i> (Roxb.)	India, Sri Lanka, Birmania	Hoja Root Flower	Hojas machacadas para hacer jugo, pasta, extracto (alcohólico) de raíz y flor.	Fiebre (en forma de pasta), otitis (jugo caído), raíz para tratar bronquitis, reumática, dispepsia, ciática, inflamación, otitis, problema nervioso, fiebre y como afrodisíaco, laxante, tónico (para el hígado) como agente	Actividad colinérgica Antiartrítico Antiinflamatorio Antidiabético	Nugraha, 2020
<i>Papilionanthes</i> (Roxb.) Schltr.	Indonesia	Entera	Ornamento	Ornamental	Antienvejecimiento	
<i>Vainilla planifolia</i> Jacks	Indonesia, México	Fruit Vaina	Decocción	Fiebre, reumatismo, histeria, aumento de energía y sistema muscular	Antimicrobiana	Nugraha, 2020
<i>Oncidium ascendens</i> Lindl.	México	Hoja	Infusión Completa	Inflamación y limpiezas (limpieza del cuerpo y del alma barriéndola)	Anticancerígeno Inducción de apoptosis	Cano Asseleih <i>et al.</i> , 2015

externamente con la planta)						
<i>Stanhopea oculata</i> (G. Lodd.) Lindl.	México	Pseudobulbo	Infusión	Dolor abdominal en mujeres	Actividad antifatiga (confirmada en una especie relacionada, <i>Stanhopea hernandezii</i>)	Cano Asseleih <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhynchostele rossii</i> (Lindl.)	México	Raíz Pseudobulbo Plántula <i>in vitro</i>	Ornamental	Ornamental	Antioxidante (escopoletina, (ácido 4-cumárico, ácido ferúlico y ácido <i>trans</i> -cinámico; ácido vainillico, vainillina y ácido 4-hidroxibenzoico y quercetina-3- <i>D</i> -galactósido, quercetina-3-glucósido y kaempferide)	Gutiérrez-Sánchez <i>et al.</i> , 2020

La forma de preparación más común alrededor del mundo es mediante decocciones, debido a que el uso del agua hirviendo puede aumentar el rendimiento de los metabolitos secundarios extraídos de plantas medicinales, debido a que los metabolitos secundarios se han relacionado a restos lipofílicos en sus estructuras (Nugraha, 2020).

2.3 Toxicidad

La concentración de metabolitos tóxicos en las plantas está determinada por la temporada de recolección, los nutrientes en el suelo y la etapa de crecimiento, entre otros. A pesar del alto consumo de plantas medicinales y productos relacionados, su toxicidad en la gran mayoría de estas aún no se ha evaluado. Algunas pueden desencadenar efectos indeseables para la salud humana debido a: (a) la interacción farmacodinámica con medicamentos recetados, (b) efectos intrínsecos, (c) interacción farmacocinética con medicamentos recetados, y (d) la presencia de contaminantes y / o microorganismos patógenos (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

Aunque las orquídeas se siguen utilizando en la medicina tradicional en todos los continentes, los estudios farmacológicos y toxicológicos de los fitoquímicos presentes en las orquídeas son escasos y se requieren para la validación de la sabiduría tradicional e implementación clínica (Hossain, 2011).

2.4 Metabolitos secundarios en orquídeas medicinales

Las orquídeas mencionadas en la tabla 1 son epífitas, estas crecen sobre otras plantas en hábitats de dosel y esto influye en los metabolitos secundarios presentes, debido a que obtienen los nutrientes como el nitrógeno y fósforo de distintas fuentes, como son los desechos del dosel durante el otoño y la lixiviación foliar del árbol huésped, el entorno único no impide que las plantas produzcan diferentes tipos de metabolitos secundarios y posean interesantes actividades terapéuticas, lo que las hace únicas y valiosas para estudios farmacológicos (Nugraha, 2020).

La distribución de los metabolitos secundarios está limitada en el reino vegetal, estos se presentan típicamente en sólo una especie o un grupo de plantas taxonómicamente relacionadas (García, 2004). No existe un patrón único de distribución de fitoquímicos presentes en las orquídeas, pero si existe una correlación entre subfamilia y subtribu con la geografía de las especies (Hossain, 2011),

Cada año se describen aproximadamente 1,600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Perez-Alonso y Jiménez, 2011). No existe un patrón de máxima producción ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que las mayores

concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas (Martínez *et al.*, 2012). Son pocos los compuestos que han sido investigados, entre ellos los alcaloides y flavonoides, debido a que son los más importantes por sus propiedades biológicas; sin embargo, la mayoría de estos fitoquímicos aún se desconocen (Hossain, 2011).

Gerlach (2010) presenta los análisis de aromas florales de 12 especies del género *Stanhopea* en México, dejando únicamente a *S. maculosa* sin investigación de aroma floral. La composición química de la fragancia floral de *S. tigrina*, presenta un mayor porcentaje de acetato de etilo, una sustancia de aroma muy fuerte y pesado, y salicilato de metilo (Williams & Whitten, 1999; Gerlach, 2009). El salicilato de metilo está relacionado con la estimulación del centro respiratorio del sistema nervioso central, también causa alteración del metabolismo de lípidos y carbohidratos y alteración de la respiración intracelular (Thompson, Toerne & Erickson 2016).

2.5 Orquídeas en México

Los ecosistemas de México más ricos y diversos en orquídeas son el bosque mesófilo de montaña, donde se encuentran 60% de sus especies, así como la selva tropical húmeda del sur del país (Rzedowski, 1996; Tejeda-Sartorius & Tellez-Velazco, 2017). Algunas especies silvestres de la familia *Orchidaceae* son utilizadas como indicadores de un ecosistema saludable (Cano-Asseleih *et al.*, 2015). En México han sido registradas en el país alrededor de 1260 especies y 170 géneros de orquídeas (Soto-Arenas *et al.*, 2007). Su distribución se relaciona con la diversidad climática y tipo de vegetación que presenta el país, se encuentran distribuidas en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, Puebla y San Luis Potosí (Villaseñor, 2003). Se estima que alrededor del 40% de las orquídeas mexicanas son endémicas (Soto, 1996; Soto Arenas *et al.*, 2007). Sin embargo, la supervivencia de estas especies endémicas se ve amenazada por diversos factores como son: la ampliación de los asentamientos humanos, la explotación, fragmentación y destrucción de sus hábitats, la contaminación, la variabilidad climática y la extracción de orquídeas de su hábitat natural (Salazar-Cerezo, 2018), debido a la sobreexplotación tanto para fines ornamentales como medicinales (Hossain, 2011).

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes, cuyo tamaño oscila de 3.0 mm hasta varios metros de altura y presentan diversos hábitos de crecimiento estas pueden ser epífitas,

litófitas y terrestres, siendo la mayor proporción la epífita (Ortiz-Arias, 2002); muestran gran complejidad y especialización en su morfología floral y tipos de polinización (Espejo *et al.*, 2002). Las orquídeas necesitan un polinizador (insectos, pájaros, moscas, abejas, mariposas, murciélagos o ranas) para que la transferencia de polen de una planta a otra sea llevada a cabo. Debido a que el polen se encuentra agrupado en masas llamadas polonias. La transferencia de granos de polen juntos dentro de la polonia asegura la fertilización de muchos de los enormes óvulos. Algunas especies tienen adaptaciones notables para la polinización, como el mimetismo visual y químico, engañando a un insecto macho para que perciba a la flor como una posible pareja (Simpson, 2010).

2.5.1 Stanhopeas en México

Gerlach (2010) mencionó que en México se encuentran 13 especies del género *Stanhopea*: *S. hernandezii*, *S. intermedia* Kingle, *S. maculosa* Knowles & Westc., *S. martiana* Lindl., *S. pseudoradiosa* Jenny, *S. radiosa* Lem., *S. saccata* Batem., *S. tigrina* Batem. ex Lindl., *S. dodsoniana* Salazar & Soto Arenas, *S. graveolens* Lindl., *S. oculata*, *S. ruckeri* Lindl. y *S. whittenii* Soto-Arenas, Salazar & Gerlach.

En México, una gran variedad de orquídeas es utilizada en la medicina tradicional, específicamente del género *Stanhopea* esta reportado que *Stanhopea oculata*, se utiliza para reducir el dolor abdominal en las mujeres. En *Stanhopea hernandezii*, se ha confirmado la actividad antifatiga (Cano-Asseleih *et al.*, 2015).

Urbina (1903) menciona que “con las flores de *S. tigrina* se preparaban a los príncipes de los indios las tortillas que comían para moderar la fatiga producida por los rayos del sol o desmayos producidos por otra causa, ya sea interna o externa”. Eng-Soon (2019) menciona que los mexicanos en el período poshispánico utilizaron *Stanhopea tigrina* para tratar la insolación y la debilidad. Sin embargo, Dodson (1975) menciona que la orquídea descrita e ilustrada por Francisco Hernández desafortunadamente fue interpretada por Schlechter como *S. tigrina*, después de una cuidadosa revisión de la ilustración de Hernández (Lamina IV), se reveló que la ilustración corresponde a *Stanhopea hernandezii* (Kunth) Schltr. en lugar de *S. tigrina*. Esta última *S. tigrina* es la orquídea de interés para este estudio, en la Huasteca Potosina los pseudobulbos son utilizados trastornos renales, mientras que hoja es utilizada para preparar una bebida que es administrada cuando la persona presenta ansiedad o estrés.

2.5.2 *Stanhopea tigrina*

Las plantas de *S. tigrina* crecen en bosques de encino húmedos, en selva mediana perennifolia, bosque de pino y encino, bosques mesófilos de la Sierra Madre Oriental, Cuetzalan, Sierra Norte de Oaxaca-Mixe (Soto-Arenas *et al.*, 2007). Se establece principalmente en la Sierra Madre Oriental entre los estados de Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz, entre los 1000 y 1500 msnm (Figura 1) (Garcia-Sanchez, 2018).

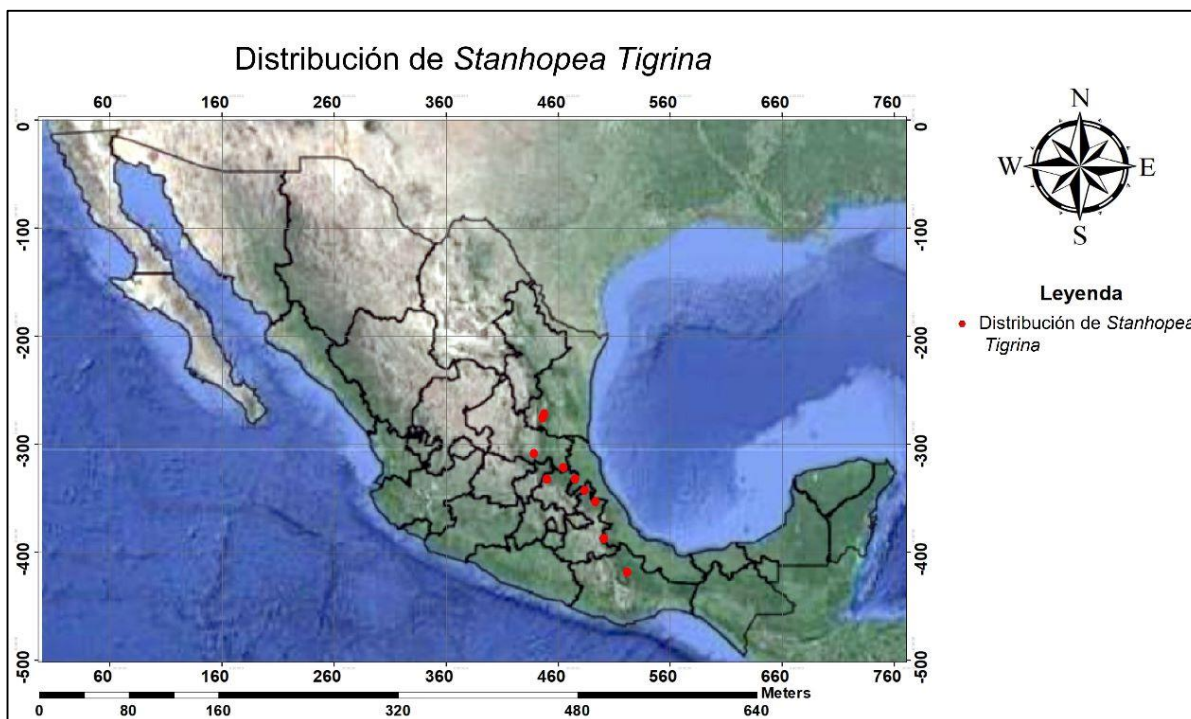


Figura 1. Distribución de *Stanhopea tigrina* en México (CONABIO, 2007).

Esta especie vegetal presenta dos hábitos de crecimiento: 1) epífita o 2) litófito, su tamaño varía de 40-70 cm de alto, tiene raíces flexuosas y sus flores se encuentran mirando hacia abajo, son muy grandes de 11 a 18 cm de diámetro, puede presentar de 1 a 2 flores simultáneas, grandes y vistosas, los sépalos son crema o amarillos con manchas variables de color púrpura a púrpura negruzcas, sus pétalos son amarillos y presentan una gran mancha púrpura en la base (Figura 2) (Soto-Arenas, 2002). Esta planta posee un labelo complejo de tres piezas, y con terminación en dos estructuras semejantes a cuernos, de ahí su nombre coloquial de “torito” (Gerlach, 2009).



Figura 2. *Stanhopea tigrina* (Eng-Soon, 2019)

Sus flores presentan un dulce y penetrante aroma que es ocasionado principalmente por la presencia del compuesto acetato de feniletilo y salicilato de metilo (Gerlach, 2010; Salazar-Cerezo, 2018). El aroma es una combinación de terpenos y aromáticos (Curry & Pridgeon, 1987; Curry *et al*, 1991), esta fuerte fragancia atrae a su polinizador la abeja macho *Euglossa viridissima*, que son polinizadores muy fuertes capaces de viajar grandes distancias (García-Sánchez, 2018; Salazar-Cerezo, 2018).

Curry *et al* (1991), mencionan que la polinización de las especies de genero *Stanhopea* es inusual porque no hay recompensa alimentaria para el polinizador, *Euglossa viridissima* se siente atraída por la fragancia producida en el osmóforo y recolectan la fragancia que es utilizada como precursora de una feromona sexual.

S. tigrina es una especie endémica reportada en la Norma Oficial Mexicana de Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres NOM-059-SEMARNAT-2010, dentro de la categoría de riesgo como una especie amenazada, debido a que puede encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo, si se siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones.

Por lo tanto, es necesario el uso de biotecnología para poner en práctica métodos de conservación que nos ayuden a preservar esta especie en peligro, la micropropagación *in vitro* ha demostrado su utilidad práctica en especies de multiplicación deficiente o relativamente lenta, como las orquídeas (Juárez & Rosas, 2007; Salazar-Cerezo, 2018).

2.6 Cultivo tejido vegetal (CTV) *in vitro*

El cultivo de tejido vegetal *in vitro* se refiere a la práctica de cultivar plantas o sus componentes (células, tejidos, órganos o protoplastos) en medios artificiales y condiciones estériles. Esta técnica aprovecha dos características esenciales de las células vegetales: la totipotencia, que se refiere a su capacidad para regenerar una planta completa, y la dediferenciación, que permite a las células volver a un estado meristemático (Martín *et al.*, 2018). Las células meristemáticas, presentes en los ápices de las plantas, se caracterizan por tener una pared celular delgada y un núcleo prominente, y se mantienen en un estado indiferenciado, dividiéndose constantemente mediante mitosis (Peña, 2013). En general, las células vegetales poseen totipotencia, lo que significa que contienen la información genética necesaria para regenerar una planta completa bajo condiciones de cultivo adecuadas (Martínez y Torres, 2018).

Los métodos de CTV más utilizados son: la organogénesis, que se refiere a la producción de brotes o raíces, directamente a partir de meristemas o indirectamente partiendo de callo células indiferenciada; y la callogénesis, que se refiere a la producción de una masa amorfa compuesta por células, el callo puede ser utilizado para la generación de plantas completas o para la producción de metabolitos en cultivos de suspensión celular (Kärkönen *et al.*, 2020).

El CTV es un proceso que requiere de una serie de etapas : etapa 1, seleccionar la planta de interés libres de enfermedades, plagas e insectos; etapa 2, selección del explante

que pueden ser pequeños cortes de hoja o tallo de la planta o el uso de semillas; etapa 3, técnicas de asepsia para la esterilización del explante; etapa 4, siembra del explante estéril en medios de cultivo apropiados; etapa 5, resguardo en condiciones de temperatura, fotoperiodos de iluminación y humedad relativa ideales hasta la formación de callo. Las siguientes etapas varían de acuerdo con el tipo de cultivo que se requiere: organogénesis o callogénesis. Los cultivos de callos se realizan en biorreactores mientras que para la organogénesis los brotes propagados se transfieren a medios de cultivo adicionados con fitohormonas para el enraizamiento y obtención de plántulas (Figura 3) (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

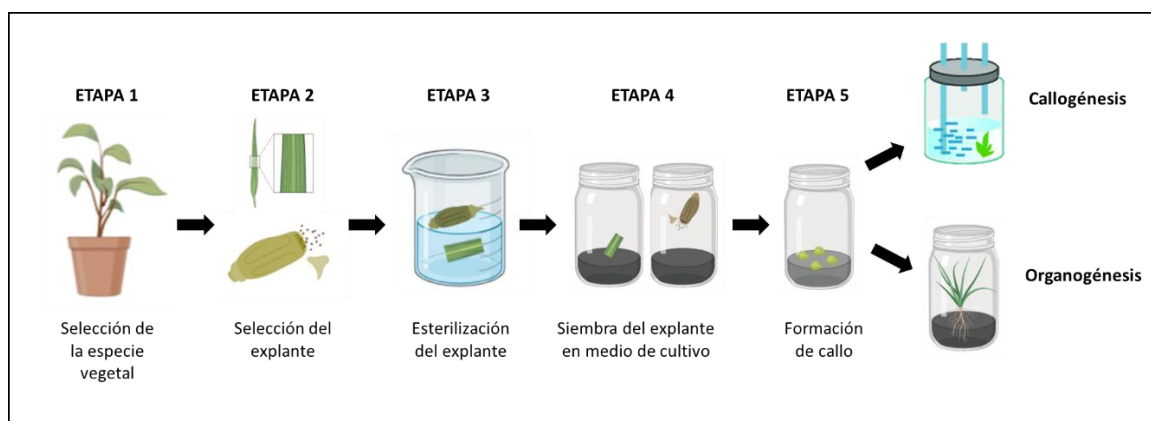


Figura 3. Proceso del cultivo de tejido vegetal (CTV) *in vitro*.

Actualmente, muchas especies de orquídeas se encuentran en riesgo de extinción o amenazadas, por lo que es crucial desarrollar estrategias efectivas para su conservación. La conservación de orquídeas medicinales puede abordarse mediante medidas tanto *in situ* como *ex situ*. Aunque la protección del hábitat es esencial debido al tamaño poblacional reducido y la distribución limitada de estas especies, la conservación *in situ* puede no ser siempre viable debido a factores como la alteración del hábitat, la migración o la ausencia de polinizadores debido a cambios ambientales adversos y la lenta tasa de propagación. Por ello, las medidas de conservación *ex situ*, como los bancos de semillas y las colecciones de tejidos vegetales cultivados *in vitro*, pueden complementar los enfoques *in situ*, permitiendo la propagación masiva y el restablecimiento de estas especies en su entorno natural (Tabla 2) (Pant, 2013).

Tabla 2. Propagación de orquídeas a través de CTV para su conservación.

Orquídea	Tipo de crecimiento	Explante utilizado	Medio de cultivo	Referencia
<i>Anacamptis longicornu</i>	Terrestre	Semillas	Orchimax (OM)	(Arcidiacono <i>et al.</i> , 2021)
<i>Ophrys panormitana</i>	Terrestre	Semillas	Orchimax (OM)	(Arcidiacono <i>et al.</i> , 2021)
<i>Cattleya tigrina</i> A. Rich. ex Beer	Epifita	Semillas	MS (Murashige & Skoog, 1962), carbón activado, sacarosa, TDZ 25 µM	(Fritsche <i>et al.</i> , 2022)
<i>Cattleya crispa</i>	Epifita	Semilla	MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarosa	Vargas-Andriolli <i>et al.</i> , 2023
<i>Rhynchostele rossii</i>	Epifita	Semillas	MS (Murashige & Skoog, 1962), carbón activado, sacarosa	(Gutiérrez-Sánchez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Coelogyne asperata</i>	Epifita	Semillas	Knudson C (KC) (Knudson, 1946)	(Alexander <i>et al.</i> , 2021)
<i>Gastrochilus japonicus</i>	Epifita	Semillas	New Dogashima (ND), trehalosa 29,2 mM	(Tokuhara <i>et al.</i> , 2023)
<i>Anacamptis papilionacea</i> (L.)	Terrestre	Semillas	MS (Murashige & Skoog, 1962), carbón activado, sacarosa, hongos micorrizicos	(Harzli & Kömpe, 2023)

<i>Dendrobium heyneanum</i> Lindl.	Epífita	Semillas Protocormos	MS (Murashige & Skoog, 1962), cinetina (KN), ácido α - naftalenoacético (NAA), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (IBA)	(Kaladharan <i>et al.</i> , 2024)
<i>Guarianthe skinneri</i>	Epífita	Semillas Protocormos	MS (Murashige & Skoog, 1962), 6bencilaminopurina (BAP),	(Hernández Ramírez <i>et al.</i> , 2023)
<i>Vanda hastifera</i>	Epífita	Segmentos apicales de hojas	Mitra basal medium (Mitra <i>et al.</i> , 1976), BAP, kinetin, NAA, IBA.	(Devina <i>et al.</i> , 2023)
<i>Rhynchostylis retusa</i> (L.)	Epífita	Semillas Protocormos	MS (Murashige & Skoog, 1962), BAP, carbón activado	(Panwar & Joshi, 2024)
<i>Phalaenopsis</i>	Epífita	Nudos de tallos florales	MS (Murashige & Skoog, 1962), BAP, IBA.	(Sarmah <i>et al.</i> , 2024)
<i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	Epífita	Semillas Plántulas	MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarosa-	(Chanh <i>et al.</i> , 2023)

2.7 Trastornos de ansiedad y crisis nerviosas

En la medicina tradicional o popular mexicana existe un grupo de enfermedades conocidas como “nervios”, “crisis nerviosas” o “mal de ojo”, las cuales se caracterizan por experimentar síntomas como pérdida de apetito, insomnio, pulso acelerado, presión alta o baja y desesperación (Guzmán *et al.*, 2014), este grupo de enfermedades populares están descritos en el Apéndice I del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales IV (DSMIV) como “síndromes ligados a la cultura” y pueden ser causados por diferentes factores que alteran el estado de ánimo induciendo ansiedad (American Psychiatric Association, 2013).

La ansiedad es una respuesta emocional normal que todos experimentamos en algún momento de nuestra vida ante situaciones que son percibidas como amenaza o estrés; sin embargo, cuando aparece una respuesta desproporcionada ante amenazas mínimas estamos ante un trastorno de ansiedad (Domínguez Domínguez *et al.*, 2024).

Las personas con trastorno de ansiedad pueden experimentar preocupación o miedo excesivo, crisis nerviosas, dificultad para concentrarse, tensión, palpitaciones, pulso acelerado, trastornos de sueño y sudoraciones, ante situaciones cotidianas, esta sintomatología puede ocasionar un estado incapacitante del individuo al mostrar poco control sobre sus emociones y acciones (Leichsenring *et al.*, 2023).

Los trastornos de ansiedad son considerados como uno de los desórdenes de mayor prevalencia en el mundo, se calcula que, en 2019, 301 millones de la población mundial (infancia, adolescencia y adultez) padecía un trastorno de ansiedad (OMS, 2023).

En el siglo XXI, se ha observado un aumento de los trastornos de ansiedad, esto debido a la interacción de factores sociales, laborales, tecnológicos y medioambientales, en este contexto de interacciones complejas es necesario tomar en cuenta a las poblaciones que están más expuestas a factores ansiogénicos, como son los pueblos originarios (Expósito-Duque *et al.*, 2024).

La salud mental en los pueblos originarios es un tema prioritario para la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas poblaciones suelen ser consideradas vulnerables por una serie de factores que incluyen: discriminación, exclusión social, pobreza, desigualdad, difícil acceso a servicios de salud y educación, pérdida de tierras y exportación ilegal de los recursos

naturales, todas estas condiciones en las que viven pueden tener un impacto en la salud mental de la población indígena (Cianconi *et al.*, 2019). ,

La Organización Mundial de la Salud, define la salud mental como: “Un estado de bienestar en el cual el individuo es consciente de sus propias capacidades, puede afrontar las tensiones normales de la vida, puede trabajar de forma productiva y fructífera y es capaz de hacer una contribución a su comunidad” (OMS, 2022).

La salud mental está estrechamente relacionada con el sistema nervioso central (SNC) y periférico, al influir en la capacidad de percibir, interpretar y experimentar emociones ante los estímulos internos y externos; un SNC sano y en equilibrio se relaciona con una buena salud mental, mientras que los trastornos mentales como la ansiedad están relacionados con los desequilibrios químicos en la producción, liberación o recepción de neurotransmisores interfiriendo en la comunicación neuronal en algunas regiones cerebrales (Macaya Sandoval *et al.*, 2018).

2.7.1 Fármacos ansiolíticos, mecanismo de acción y efectos secundarios.

Los tratamientos farmacológicos diseñados para los trastornos de ansiedad son conocidos como ansiolíticos, van desde los barbitúricos, antihistamínicos, bloqueadores beta o ansiolíticos no sedativos como la buspirona, hasta los benzodiacepinas (BZD) (Cardoner Álvarez & Segalàs Cosí, 2003). El grupo de BZD son sustancias depresoras del sistema nervioso central que a dosis bajas presentan efecto ansiolítico, mientras que a dosis altas se observan efectos sedativos-hipnóticos (Vicente *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción de los fármacos ansiolíticos varía de acuerdo al tipo de fármaco, pero en general actúan sobre neurotransmisores del SNC, las BZD aumentan la actividad del inhibidor ácido gamma-aminobutírico (GABA) induciendo un efecto calmante, relajación muscular y reduciendo la ansiedad; algunos fármacos antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN) también se usan como ansiolíticos, estos aumentan los niveles de serotonina, y disminuyen la noradrenalina y adrenalina a nivel cerebral, disminuyendo la ansiedad (Bourin, 2021).

Los efectos ansiolíticos de los neurotransmisores GABA, serotonina, noradrenalina y adrenalina están asociados con los sistemas gabaérgico, serotoninérgico y adrenérgico respectivamente, y se conocen como los principales sistemas de neurotransmisores implicados en los trastornos de ansiedad (Carmichael & Lockhart, 2012).

En el sistema gabaérgico el neurotransmisor GABA actúa como agonista ejerciendo su efecto inhibitor en los receptores GABA_A y GABA_B, los receptores GABA_A son receptores ionotrópicos que funcionan como canales permeables al Cl⁻ originando una hiperpolarización, a través de los cuales se puede regular la tensión muscular, el estado de alerta y la ansiedad; mientras que los receptores GABA_B conocidos como receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G (guanina, guanosina trifosfato y difosfato guanosina) y modulan la actividad enzimática (enzimas E) asociándose principalmente con las sinapsis glutamatérgicas, lo cual genera una disminución de los síntomas de los trastornos emocionales como la ansiedad y depresión (Terunuma, 2018; Ochoa-de la Paz *et al.*, 2021). El sistema serotoninérgico utiliza como neurotransmisor la serotonina también conocida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), la sintetiza en los núcleos del rafe y actúa a través de los autorreceptores de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₃ presinápticos y postsinápticos, regulando las emociones, locomoción, estrés, la depresión y la ansiedad (Bourin, 2021). En el sistema adrenérgico las catecolaminas: adrenalina (hormona) y la noradrenalina (neurotransmisor), llamadas así por contener un anillo de catecol en su estructura química, son liberadas por las glándulas suprarrenales en respuesta a situaciones de estrés, ansiedad e ira, ejerciendo sus efectos mediante los receptores α 1-AR y α 2-AR (Pytko *et al.*, 2016; Alcántara-Hernández & Hernández-Méndez, 2018), dependiendo de los niveles de noradrenalina los receptores α 1-AR y α 2-AR regulan la actividad neuronal, la noradrenalina tiene una mayor afinidad por los receptores adrenérgicos α 2-AR que por los receptores α 1-AR, cuando existen condiciones sin estrés se tienen niveles basales de noradrenalina y se activan los receptores adrenérgicos α 2-AR, sin embargo cuando existen niveles elevados de noradrenalina se une preferentemente a los receptores adrenérgicos α 1-AR, una alta concentración de noradrenalina en la corteza prefrontal medial (mPFC) puede estar implicada en los deterioros de la regulación emocional provocando un comportamiento similar a la ansiedad y disfunción cognitiva (Kawanabe *et al.*, 2023).

En los estudios donde se examinó el efecto del aislamiento social en ratas, se encontró que el grupo de ratas socialmente aisladas durante 8 semanas exhiben una mayor concentración de noradrenalina en el cerebro ($1.18 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$) teniendo como respuesta una disminución de la función cognitiva y un aumento del comportamiento similar a la ansiedad, mientras que para el grupo control en las ratas en condiciones sin estrés se encontraron concentraciones de noradrenalina más bajas ($97.02 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$) confirmando que la estimulación social se asocia con la liberación reducida de noradrenalina (Heritch *et al.*, 1990).

Los fármacos ansiolíticos pueden producir un gran número de efectos adversos, entre los que se encuentran: la sedación debido a que pueden producir alteraciones en la coordinación motora, lentitud de reflejos, ataxia y falta de concentración, por lo que incrementa el riesgo de caídas o accidentes de tráfico; el síndrome de abstinencia crea una dependencia física o psíquica al fármaco; el deterioro cognitivo debido a que pueden llegar a afectar el rendimiento de aprendizaje y la atención durante el día; el aumento de la tolerancia pues se requiere una mayor dosis para obtener el mismo efecto terapéutico; y durante el embarazo el consumo de BZD en el primer trimestre se ha asociado con malformaciones neurológicas (Also Fontanet *et al.*, 2024). Por lo tanto, aunque se han logrado avances en los tratamientos para los trastornos de ansiedad aún se necesitan más investigaciones para buscar nuevas sustancias partiendo del conocimiento popular o medicina tradicional para poder desarrollar otros fármacos con efectos ansiolíticos, pero con el menor número de efectos no deseados (Gołyszny & Obuchowicz, 2018).

2.7.2 Medicina tradicional mexicana para la ansiedad

En México, el uso de plantas medicinales para aliviar los síntomas de ansiedad es una práctica que ha existido a través del tiempo y que en los últimos años ha ido en aumento, a pesar de que existe poca evidencia científica que valide la eficacia para poder garantizar la confiabilidad de su uso (López-Rubalcava & Estrada-Camarena, 2016). Los tratamientos o remedios caseros incluyen infusiones o decocciones de hierbas, preparadas con una sola planta o una mezcla de plantas y son utilizados por las poblaciones urbanas y rurales (Guzmán *et al.*, 2014). Algunas de las plantas reportadas para el tratamiento de trastornos relacionados con la ansiedad o crisis nerviosas, han sido sometidas a estudios etnobotánicos e investigaciones neurobiológicas preclínicas utilizando modelos de ansiedad en animales,

como el laberinto de cruz elevado (EPM), prueba de natación forzada, campo abierto, actividad locomotora, varilla giratoria (rotarod), entre otros (Fajemiroye *et al.*, 2016). A continuación, se muestran algunas plantas que se utilizan en la medicina popular de México para el tratamiento de los nervios, espanto o susto, términos comunes asociados con los trastornos de ansiedad y que han sido analizadas en investigaciones preclínicas (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios preclínicos de algunas plantas medicinales utilizadas para trastornos de ansiedad en México.

Nombre científico	Familia	Uso medicinal popular	Estudios preclínicos	Referencia
<i>Achillea millefolium</i> L.	Asteraceae	Ansiedad, insomnio, inflamación y trastornos gastrointestinales	Laberinto en cruz elevado, enterrado de mármol y campo abierto	(Baretta <i>et al.</i> , 2012)
<i>Agastache mexicana</i> spp.	Lamiaceae	Mal de ojo, espanto y nervios.	Laberinto en cruz elevado, natación forzada y campo abierto	(Molina-Hernández <i>et al.</i> , 2000)
<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	Annonaceae	Relajante, antimalárico, antihelmíntico, cardiotónico, edema, diabetes	Laberinto en cruz elevado, campo abierto	(Rejón-Orantes <i>et al.</i> , 2011)
<i>Byrsonima crassifolia</i> L.	Malpighiaceae	Enfermedades relacionadas con la mente	Natación forzada	(Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2011)

<i>Casimiroa edulis</i> La Llave et Lex	Rutaceae	Hipertensión arterial, ansiedad, insomnio	Laberinto en cruz elevado, natación forzada y campo abierto	(Molina- Hernández <i>et al.</i> , 2004)
<i>Cinnamomum spp</i>	Lauraceae	Asma, bronquitis, diarrea, dolor de cabeza, inflamación y trastornos cardíacos	Laberinto en cruz elevado y rotarod	(Yu <i>et al.</i> , 2007); Upadhyay <i>et al.</i> , 2016)
<i>Cymbopogon citratu</i> (DC.) Stapf	Gramíneas	Dolor de estómago, vómito, diarrea, convulsiones y ansiedad	caja clara/oscura, enterrar canicas y natación forzada	(Costa <i>et al.</i> , 2011)
<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Fabaceae	Tranquilizante y/o sedante	Laberinto en cruz elevado, nado forzado, actividad locomotora espontánea y habitua	(Raupp <i>et al.</i> , 2008)
<i>Galphimia glauc</i> Cav	Malpighiaceae	Excitación nerviosa	Laberinto en cruz elevado, luz-oscuridad,	(Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2006)

			natación forzada	
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lamiaceae	Estrés, relajante, diurético, ansiedad	Campo abierto y laberinto elevado en cruz	(Lejeune <i>et al.</i> , 2023)
<i>Loeselia mexicana</i> L.	Polemoniaceae	Espanto, miedo, insomnio y fatiga	Laberinto en cruz elevado	(Maribel Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2011)
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Passifloraceae	Nerviosismo e insomnio	Laberinto en cruz elevado	(Grundmann <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.)	Annonáceas	Reumatismo, gastrointestinales, respiratorios y renales	Cilindro exploratorio, hipnosis inducida por pentobarbital y rotarod	(Estrada- Reyes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Salvia elegans</i> Vahl.	Lamiaceae	Ansiedad	Laberinto en cruz elevado, natación forzada, luz- oscuridad y campo abierto	(Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2006)
<i>Ternstroemia sylvatica</i> Schltdl. & Cham	Teáceas	Ansiedad	Campo abierto, laberinto elevado y nado forzado	(Molina <i>et al.</i> , 1999)
<i>Tilia americana</i>	Tiliaceae	Insomnio, el dolor de cabeza y	Laberinto en cruz elevado	(Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2008)

var. mexicana		la excitación		
(Schltdl)		nerviosa		
<i>Valeriana edulis</i> ssp. procera	Caprifoliaceae	Insomnio y ansiedad	Rotarod,	(Oliva <i>et al.</i> , 2004)
			hipnosis inducida por pentobarbital, actividad anticonvulsiva,	
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Caprifoliaceae	Trastornos leves del sueño y tensión nerviosa	Actividad locomotora, anestesia inducida por éter, laberinto elevado, natación forzada y alambre horizontal	(Hattesoehl <i>et al.</i> , 2008)

La farmacognosia tradicional suele utilizar metabolitos vegetales específicos aislados y purificados de las hierbas medicinales, sin embargo, las plantas contienen una gran variedad de compuestos bioactivos que pueden interactuar de forma sinérgica y producir efectos farmacológicos mayores (Sarris *et al.*, 2011) Las investigaciones fitoquímicas han revelado la presencia de diversos fitoquímicos con actividad ansiolítica que han sido utilizadas en la medicina tradicional por su potencial en el tratamiento de trastornos relacionados con el miedo, la ansiedad y el trauma (Sartori & Singewald, 2019).

2.8 Trastornos renales urológicos

Los trastornos urológicos están relacionados con un estilo de vida poco saludable, falta de actividad física, una alimentación poco saludable y la obesidad, estas condiciones aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades vasculares, niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de colesterol HDL, desequilibrios hormonales, presión arterial alta (hipertensión) y síndrome metabólico, estos desordenes comprenden una amplia gama de problemas urológicos que afectan la función de los riñones, entre ellos se encuentran: las infecciones del tracto urinario (ITU), la glomerulonefritis, la nefritis intersticial, los cálculos renales, la insuficiencia renal aguda, la insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, y la enfermedad renal poliquística (Dodson *et al.*, 2011; Gambaro *et al.*, 2017; Moini *et al.*, 2020).

En este contexto, las prácticas de la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades renales y dolencias asociadas con el riñón son la principal forma de atención de salud para muchas poblaciones de bajos y medianos ingresos, las plantas medicinales utilizadas están enfocadas en ayudar a los riñones en la eliminación de toxinas y desechos a través de la filtración de la sangre y producción de orina (Stanifer *et al.*, 2017). En la siguiente tabla 4, se muestran los efectos farmacológicos y los compuestos bioactivos de algunas plantas medicinales utilizadas para trastornos urológicos en la medicina popular de países de cuatro continentes: América del Norte (México), Europa, África y Asia (Tabla 4).

Tabla 4. Algunas plantas medicinales con efectos farmacológicos renales urológicos.

Nombre científico y familia	Efecto farmacológico renal/urológico	Compuesto bioactivo	Referencias
<i>Abelmoschus manihot</i> (Malvaceae)	Renoprotector, reducción de la albuminuria en pacientes con diabetes tipo 2 y enfermedad renal diabética	Quercetina, la isorhamnetina, el sulfato de quercetina, el monoglucurónido de quercetina y el monoglucurónido de isorhamnetina	(Diao <i>et al.</i> , 2023)

<i>Achyranthes aspera</i> (Amaranthaceae)	Efecto diurético	Flavonoides	(Srivastav <i>et al.</i> , 2011)
<i>Angelica sinensis</i> (Umbelíferas)	Mejora el daño renal diabético en ratas, inhibidor de la expresión del factor nuclear κ B (NF- κ B) en riñones diabéticos	Arabinoglucano	(Sui <i>et al.</i> , 2019)
<i>Astragalus membranaceus</i> (Fabáceas)	Mejora el daño renal hipertensivo a través de la red de coexpresión de lncRNA-mRNA	Isoflavonoides, 10-hidroxi-3,9-dimetoxipeterocarpan, (3R)8,2'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavan, formonenetin (7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona), 8,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-isoflavona, 2'-hidroxi-3',4'-dimetoxiisoflavan-7-O-glucopiranosido y alicósina (7,3'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona)	(Zhang <i>et al.</i> , 2012; Zhou <i>et al.</i> , 2022)
<i>Azima tetracantha</i> (Salvadoraceae)	Agente nefroprotector eficaz en la insuficiencia renal	-	(Arunachalam <i>et al.</i> , 2021)

	crónica inducida por adenina en ratas albinas Wistar		
<i>Bixa orellana</i> (Bixaceae)	Actividad diurética	-	(Radhika <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cornus officinalis</i> (Cornaceae)	Alivia la fibrosis renal	Flavona isoginkgetina	(Wang <i>et al.</i> , 2024)
	Efecto renoprotector. Revierte los cambios hemodinámicos glomerulares, regulador del factor nuclear derivado de eritroides 2 (Nrf2), protección contra lesión renal	Curcumina	(Trujillo <i>et al.</i> , 2013; Fan <i>et al.</i> , 2020)
<i>Larrea tridentata</i> (Zygophyllaceae)	Trastornos renales, activación del factor nuclear eritroide (NRF2)	ácido nordihidroguaiarético (lignano fenólico)	(Manda <i>et al.</i> , 2020)
<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Efecto diurético	Polifenol manguiferina	(Devi, 2011)
<i>Mimosa pudica</i> Linn (Fabaceae)	Efecto diurético	-	(Sangma <i>et al</i> 2010)
<i>Taraxacum</i> <i>officinale/Dandelion</i> (Asteráceas)	Potente diurético similar a furosemida	Flavonoides y compuestos fenólicos	(Rácz-Kotilla <i>et</i> <i>al.</i> , 1974)

	Efectos protectores	
<i>Zingiber officinale</i>	mediados por la	
<i>roscoe</i>	mejora de la	-
(Zingiberaceae)	expresión de NRF2	(Fathi <i>et al.</i> , 2021)
	y TNF- α .	

Las investigaciones de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de enfermedades renales o urológicas demuestran su beneficio terapéutico debido a que pueden conferir efectos renoprotectores (Khan *et al.*, 2022).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio etnobotánico

El estudio etnobotánico se realizó de enero a mayo de 2022 para registrar los usos medicinales de *S. tigrina* en la región de la Huasteca Potosina, habitada por las etnias náhuatl, tenek y pame, quienes han desarrollado formas de tratar enfermedades con los recursos vegetales obtenidos del medio ambiente según sus creencias, costumbres e ideologías. Se visitaron los tianguis de Xilitla, Aquismón y Tamasopo, municipios de San Luis Potosí, México, ubicados en la Sierra Madre oriental. Se aplicaron 22 entrevistas semiestructuradas para obtener información sobre *S. tigrina*, como nombre común, uso medicinal, parte utilizada, método de obtención, preparación, efectos secundarios o molestias y posibles combinaciones con medicina alopática. También se recogieron datos socioculturales, como género, edad y ocupación (ANEXO 1). Los datos se organizaron en frecuencias y porcentajes de citas de conocimientos tradicionales. El nivel de uso significativo se estimó siguiendo la metodología TRAMIL propuesta por Germosén-Robineau (Boulogne *et al.*, 2011).

3.2 Material vegetal

3.2.1 Recolecta *in situ* de *S. tigrina*

La recolecta de ejemplares de *S. tigrina* silvestre se llevó a cabo *in situ* en Barrio de Joljá, Tampaxal, Aquismón, municipio perteneciente al estado de San Luis Potosí (Figura 4) durante el mes de julio del 2021. En la Huasteca Potosina esta especie es conocida comúnmente como “orquídea calavera” o “calaverita”. Presenta hábitos de crecimiento litófito y epífito, se encontró posada sobre *Sambucus nigra* var. *canadensis* (L.) Bolli (sauco) y sobre rocas sedimentarias calizas cubiertas de musgo, en el bosque de niebla de la sierra alta de Aquismón en las coordenadas 21°31'44.8"N 99°03'27.8"W a una altitud de 819 (m s. n. m.) metros sobre el nivel del mar. También se recolectó un ejemplar para su posterior identificación taxonómica en el Herbario Isidro Palacios del IIZD de la UASLP (ANEXO 2).

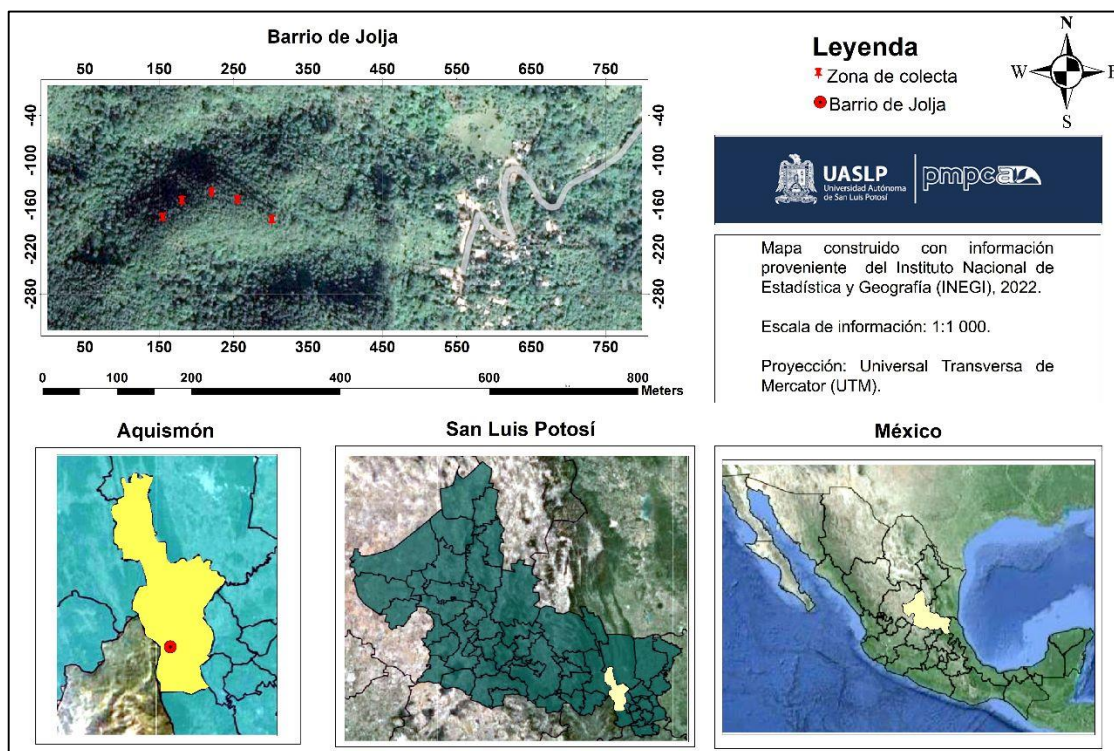


Figura 4. Sitio de colecta de los ejemplares de *S. tigrina*.

3.2.2 Resiembra de vitroplantas de *S. tigrina*

Se utilizaron vitroplantas de *S. tigrina*, conservadas en el cuarto de cultivo del laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca. En condiciones de la campana de flujo laminar, las vitroplantas se extrajeron y se resembraron en medios de cultivo con 4.43 g/L de medio semisólido Murashige y Skoog (MS) basal suplementado con vitaminas, sacarosa al 3%, 3g/L de carbón activado (Karl S.A. de C.V, León, México) y 8g/L de agar plant. Se realizaron cinco lotes de resiembra, cada lote conformado por 25 frascos, en cada frasco se colocaron cuatro plántulas de *S. tigrina* (Figura 5).

El cuarto de cultivo se mantuvo con una intensidad lumínica de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ generados con lámparas fluorescentes, de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 70%. Se evaluó el crecimiento, oxidación y contaminación de las vitroplantas cada semana durante cuatro

meses de cultivo, se registró la longitud inicial y final de las plántulas, así como el número de hojas y raíces nuevas.

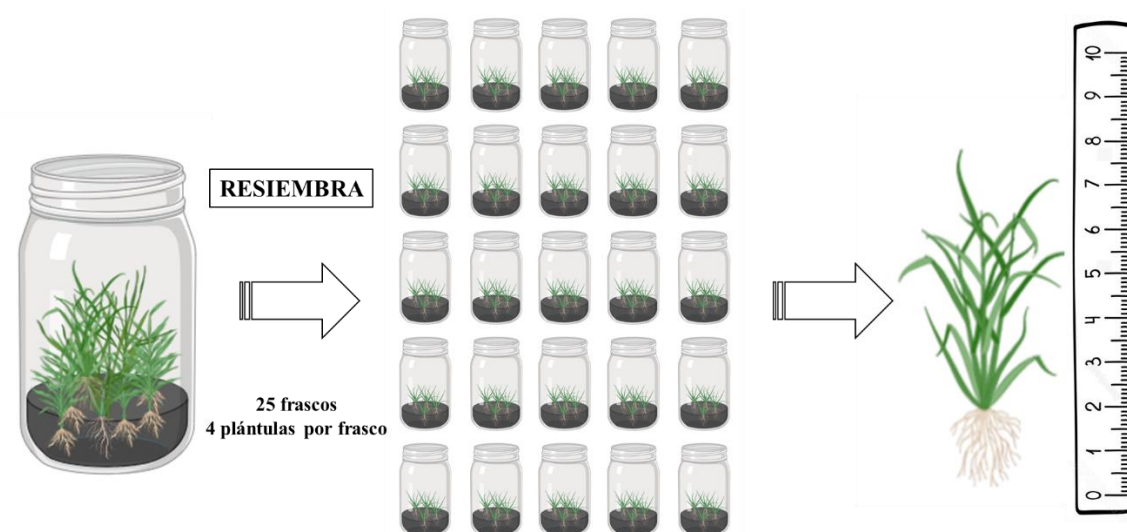


Figura 5. Diseño experimental de la resiembra de vitroplantas de *S. tigrina*.

3.2.3 Germinación *in vitro* de semillas de *S. tigrina*

Se recolectaron capsulas antes de la dehiscencia de *S. tigrina*. Las cápsulas obtenidas, fueron sometidas a un proceso de asepsia superficial con jabón antibacterial al 30% por 20 min, AgNO_3 al 10% por 10 min, etanol al 70% por 2 min, y finalmente con hipoclorito de sodio al 10% por 10 min. En condiciones de la campana de flujo laminar, las semillas fueron extraídas y sembradas en medios de cultivo. Las semillas fueron cultivadas en $\frac{1}{2}$ de medio semisólido Murashige y Skoog (MS) basal suplementado con vitaminas, sacarosa al 3% y 8 g/L de agar plant. Las unidades experimentales se mantuvieron en el cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de $40 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ generados con lámparas fluorescentes, de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. La temperatura del cuarto de cultivo es de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 70%. Se evaluó el porcentaje de respuesta y contaminación cada semana durante un mes de cultivo, y se registró la formación de cuerpos similares a protocormos (PLB) a los 30 y 45 d de cultivo.

3.3 Obtención de los extractos

El material vegetal de *S. tigrina* tanto los ejemplares silvestres como las vitroplantas se sometieron a un proceso de secado, en la estufa de convección (marca Lindberg/Blue M modelo MO1450A-1) a una temperatura de 40°C durante 24 h. El material vegetal seco se pulverizó en el molino analítico (marca IKA modelo M20) hasta obtener partículas lo más finas posible. Previamente las plantas silvestres se seccionaron en hoja y pseudobulbo, mientras que las plántulas *in vitro* se utilizaron de forma completa.

Se realizaron extracciones acuosas mediante decocción de acuerdo con la forma tradicional de preparación en comunidades de la Huasteca Potosina, se realizó un extracto de pseudobulbo y otro de hoja en una relación 20:80 peso/volumen (p/v), los cuales fueron codificados con las iniciales PA y HA. También se realizaron extracciones etanólicas mediante el método de extracción asistida por microondas (EAM). En el microondas (marca Anton Paar modelo Multiwave PRO), las extracciones se realizaron en una relación 20:80 p/v, para hoja (HE), pseudobulbo (PE) y plántula *in vitro* (IE). Posteriormente, se realizó el filtrado con papel filtro (marca Whatman) No. 2 para la eliminación de la fibra y partículas grandes, finalmente para la concentración del extracto se realizó la eliminación de los solventes con el Rotavapor (marca Büchi modelo R-100) (Figura 6).

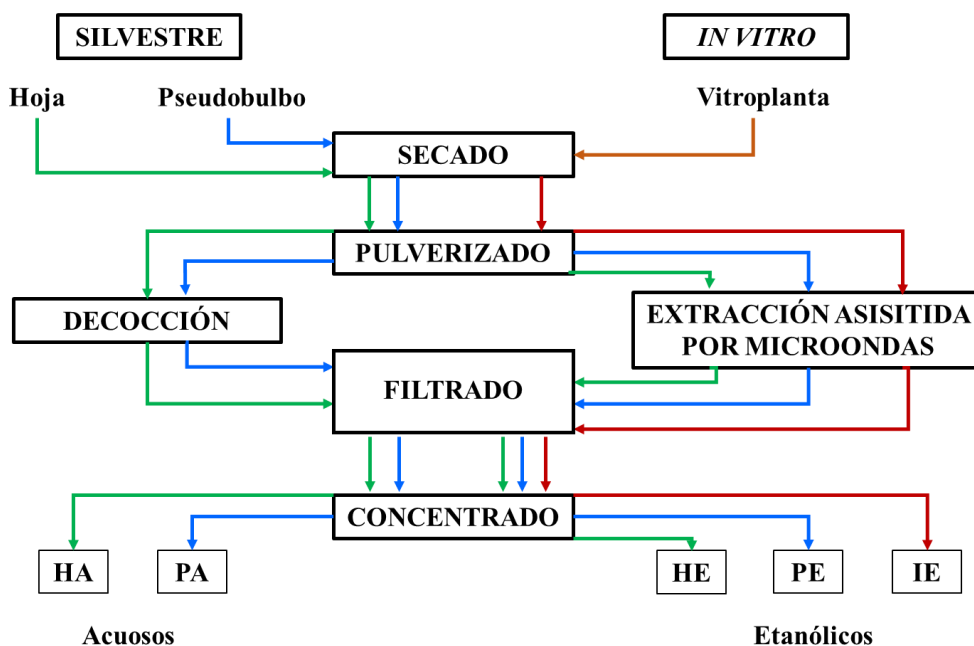


Figura 6. Esquema de los procesos de extracción para *S. tigrina*.

El material sólido resultante de la extracción se colocó en la estufa de convección (marca Lindberg/Blue M modelo MO1450A-1) a una temperatura de 40°C durante una hora para la eliminación total de humedad, posteriormente los extractos fueron pesados en una balanza analítica Citizen® con una precisión de 0.0001 g. Con los datos obtenidos se obtuvieron los porcentajes de rendimiento, mediante la siguiente ecuación.

$$\%R = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100 \quad (1)$$

Donde:

W_i = peso inicial de la planta pulverizada seca.

W_f = peso final después de obtener el extracto.

$\%R$ = Porcentaje de rendimiento.

3.4 Tamizaje fitoquímico cualitativo

Se realizó el tamizaje fitoquímico para los extractos HA, PA, HE, PE e IE, con la finalidad de comparar la actividad biológica presente entre tipo de extracción (acuoso y etanólico) y órgano de la planta (hoja y pseudobulbo), atribuida a compuestos bioactivos o metabolitos secundarios, que incluyen; alcaloides, esteroides, insaturaciones, sesquiterpenlactonas, flavonoides, flavonas, cumarinas, oxhidrilos fenólicos, glucósidos cardíacos y saponinas (Figura 7). Se prepararon concentraciones al 5%, se pesaron 50 mg de cada uno de los extractos HA, PA, HE, PE e IE y se agregaron 5 mL de agua destilada, para cada ensayo se siguió la siguiente metodología. Los resultados fueron expresados como: (-) ausente, (+) presentes, (++) moderados y (+++) abundantes.

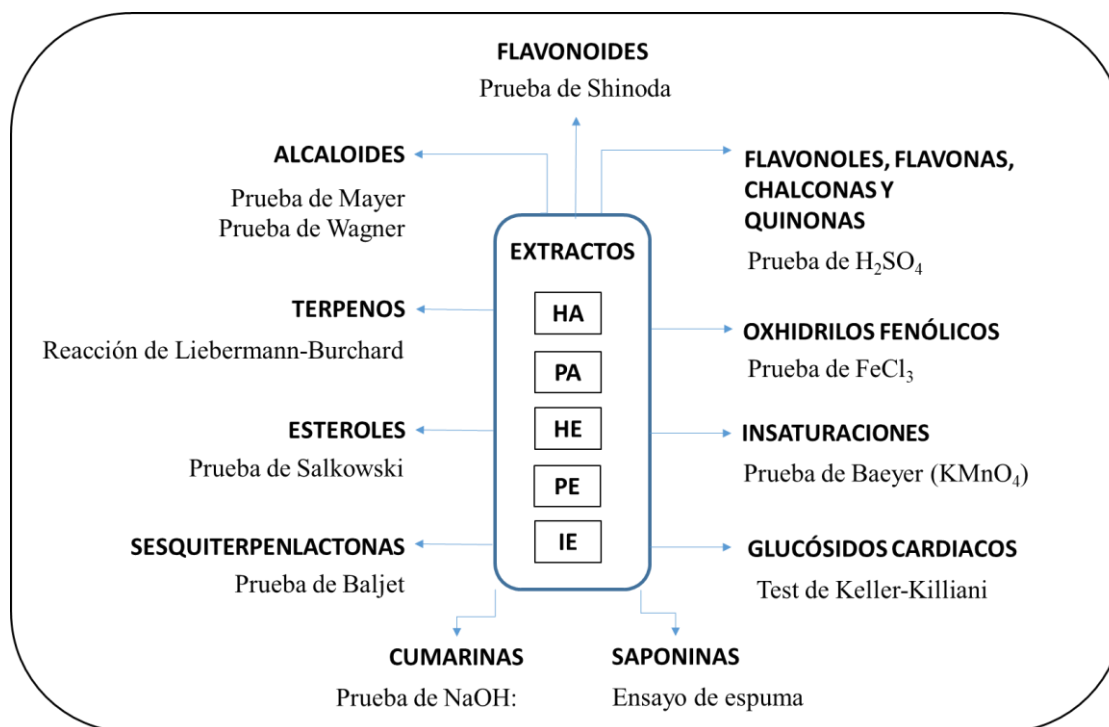


Figura 7. Determinaciones fitoquímicas cualitativas de los extractos de *S. tigrina*.

3.4.1 Determinación de alcaloides

Para la determinación de alcaloides los extractos secos de HA, PA, HE, PE e IE se hicieron reaccionar con HCl al 1%, posteriormente se filtró y se desechó el residuo. Esto con la finalidad de que los alcaloides presentes en la planta en forma de sales de ácidos orgánicos pasen a formar clorhidratos del alcaloide.

Prueba de Mayer: En un tubo de ensayo se colocaron 200 μ L del extracto y se le agregaron tres gotas del reactivo de Mayer cuidadosamente por un lado del tubo de ensayo. Esta prueba se basa en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal, en su forma de clorhidratos (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con el reactivo de Mayer (Cloruro mercúrico con yoduro de potasio). Un precipitado blanco-cremoso, indico la prueba como positiva. Se utilizó agua destilada como control negativo y como control positivo cafeína. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Moushome *et al.*, 2016).

Prueba de Wagner: Se tomaron 200 μL del extracto se adicionaron tres gotas del reactivo de Wagner cuidadosamente por un lado del tubo de ensayo. Ante la presencia de la acidez de los alcaloides se forma un precipitado marrón-rojizo, indicando la prueba como positiva. Se utilizó agua destilada como control negativo y como control positivo cafeína. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Moushome *et al.*, 2016).

3.4.2 Determinación de terpenos

Reacción de Liebermann-Burchard: En un tubo de ensayo se disolvieron 200 μL del extracto con 200 μL de cloroformo. De la solución anterior, se tomaron 200 μL y se mezclaron con 200 μL de anhidro acético y 200 μL de H_2SO_4 concentrado. Los cambios de color indican la presencia de triterpenos y/o compuestos esteroidales, un anillo azul-verde indica la presencia de terpenoides. Se utilizó agua destilada como control negativo y como control positivo aceite de almendra. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Ashraf *et al.*, 2022).

3.4.3 Determinación de esteroides

Prueba de Salkowski: En un tubo de ensayo se agregaron 200 μL del extracto, 200 μL de cloroformo y 200 μL de H_2SO_4 concentrado. Al detectar la presencia de colesterol y otros esteroides se desarrolla un color amarillo o café rojizo, indicando la prueba como positiva. Se utilizó agua destilada como control negativo y yuca como control positivo. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Ashraf *et al.*, 2022).

3.4.4 Determinación de sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet: Se prepararon dos soluciones, para la solución A: se colocó 5.0g de ácido pícrico en 50 mL de etanol para la solución B: se agregaron 5 g de NaOH en 50 mL de agua, las soluciones A y B se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. En un tubo de ensayo se agregaron 200 μL del extracto y 4 gotas de la mezcla de soluciones anterior. Ante la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas la muestra adquirió una coloración naranja o rojo oscuro. Se utilizó agua destilada como control

negativo y como control positivo apio. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Moushome *et al.*, 2016).

3.4.5 Determinación de cumarinas

Prueba de NaOH: Se colocaron 200 μL del extracto en un tubo de ensayo, se le agregaron 200 μL de solución de NaOH al 10%. La prueba fue positiva al aparecer una coloración amarilla que desapareció al acidular con 20 μL de HCl. Se utilizó agua destilada como control negativo y como control positivo canela. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Alemu *et al.*, 2024).

3.4.6 Determinación de Flavonoides

Prueba de Shinoda: En un tubo de ensayo se colocaron 200 μL de extracto y limadura de magnesio, posteriormente se añadieron gotas de HCl concentrado por las paredes. La prueba fue positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, azul a violeta. Se utilizó agua destilada como control negativo y como control positivo yuca. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Alemu *et al.*, 2024).

3.4.7 Determinación de flavonoles, flavonas, chalconas y quinonas

Prueba de H_2SO_4 : Se colocaron 200 μL del extracto en un tubo de ensayo, posteriormente se agregaron 200 μL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba fue positiva cuando se observaron coloraciones amarillas para flavonas y flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo-azulosa para chalconas y rojo-purpura para quinonas. Se utilizó agua destilada como control negativo y guayaba como control positivo. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Alemu *et al.*, 2024)

3.4.8 Determinación de oxhidrilos fenólicos

Prueba de FeCl_3 : Se colocaron 200 μL del extracto en un tubo de ensayo y se le adicionaron gotas de FeCl_3 al 5%. La prueba fue positiva ante la presencia de compuestos fenólicos o taninos, el ión cloruro del FeCl_3 protona al fenol formando un fenóxido con la consecuente aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Alemu *et al.*, 2024).

3.4.9 Determinación de insaturaciones

Prueba de Baeyer (KMnO_4): Se agregaron 200 μL del extracto a un tubo de ensayo, se añadió gota a gota una solución de KMnO_4 al 2%. La presencia de enlaces dobles o triples indican una prueba fue positiva al observar decoloración o formación de un precipitado café, resultado de la formación de bióxido de manganeso (MnO_2). Se utilizó agua destilada como control negativo y como control positivo aceite de oliva. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Sinha *et al.*, 2023).

3.4.10 Determinación de Saponinas

Ensayo de espuma: en un tubo de ensayo con 200 μL de extracto y 1 mL de agua destilada agitar por 15 s, observar si se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón. Se mide altura y el tiempo que dura la espuma formada (mínimo un min). Esta es una prueba presuntiva de saponinas, ya que existen otras sustancias que también pueden formar espuma. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Soltani *et al.*, 2014).

3.4.11 Determinación de glucósidos cardiacos

Test de Keller-Killiani: Se mezclaron 0.5 gr del extracto con 5 mL de agua destilada en un tubo de ensayo. Posteriormente, se agregaron 2 mL de ácido acético glacial con unas gotas de cloruro férrico, seguido por 1 mL de H_2SO_4 . La formación de un anillo café en la interface indicó un resultado positivo para glucósidos cardiacos. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los extractos (Amaringo Villa & Hormaza, 2011).

3.5 Ensayos para determinar capacidad antioxidante de los extractos de *S. tigrina*

3.5.1 Método ABTS (ácido 2,2ázinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

El radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se generó mediante la reacción estequiométrica de la solución ABTS 7mM con el agente oxidante persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 2.45 mM. en una relación 1:0.5, se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h para asegurar la formación completa del radical. El radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia inicial de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm (Re, 1999).

Para la medición de las muestras se prepararon concentraciones conocidas en un rango de 2-10 mg/mL de cada uno de los extractos (PE, PA, HE, HA y IE), de cada concentración se tomaron 20 μL y se agregaron 2 mL del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ajustado a $0.70 \pm 0.02 \text{ A}^\circ$. La mezcla se resguardo en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm. Se utilizó etanol como blanco. Todas las mediciones se hicieron por triplicado. La decoloración o disminución en la absorbancia fue proporcional a la capacidad antioxidante del extracto, ya que el antioxidante redujo el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a su forma neutra (Figura 8).

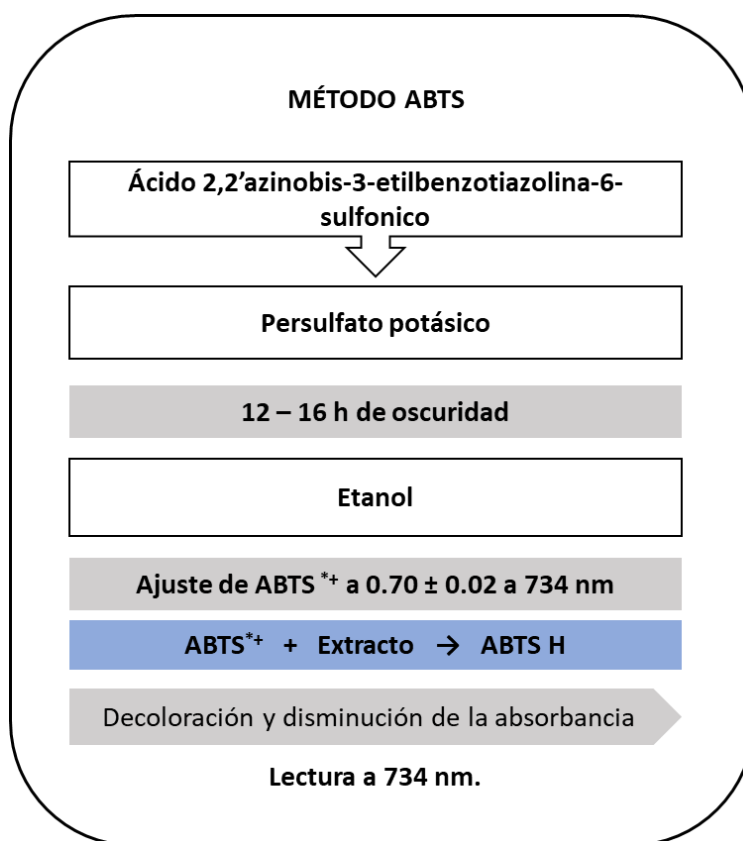


Figura 8. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS en extractos de *S. tigrina*.

3.5.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El estudio complementario para la capacidad antioxidante de los extractos fue confirmado por el ensayo de eliminación de DPPH. El radical DPPH[•] se preparó a una concentración de 69 mg/L utilizando metanol como disolvente, la solución se ajustó con metanol a una absorbancia de 1.8 ± 0.02 a una longitud de onda de 520 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Para cada extracto se prepararon concentraciones conocidas en un rango de 2-10 mg/mL. La actividad antioxidante fue determinada usando 400 μ L del extracto y se agregaron 3 mL del radical DPPH[•] ajustado a 1.80 ± 0.02 A°, se agitó por 30 s y se resguardó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min, finalmente se midió la absorbancia a 520 nm. Se utilizó etanol como blanco. Todas las mediciones se hicieron por triplicado (Figura 11).

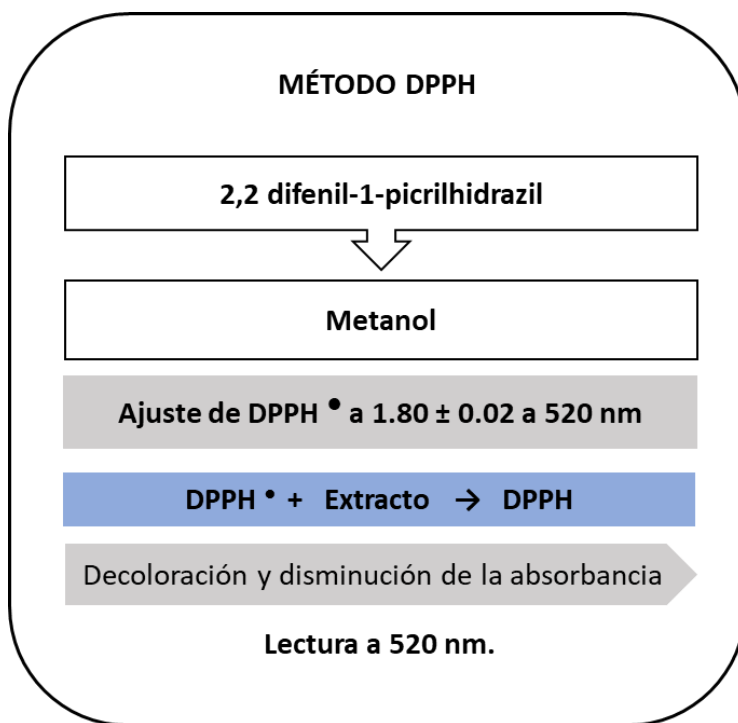


Figura 9. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH en extractos de *S. tigrina*.

3.5.3 Interpretación de resultados ABTS y DPPH

La capacidad antioxidante del extracto se comparó con la de la solución estándar de ácido ascórbico, los resultados se expresaron como Concentración Equivalente de Ácido Ascórbico (VCEAC $\mu\text{g/mL}$) (ANEXO III y IV). Las absorbancias obtenidas de los extractos fueron interpoladas en la curva de calibración del ácido ascórbico mediante regresión lineal, utilizando la siguiente formula:

$$y = mx + b \quad (2)$$

Donde:

- $y = A^\circ$ del radical más el extracto
- $x =$ Concentración equivalente al ácido ascórbico (VCEAC $\mu\text{g/mL}$)
- $b =$ ordenada al origen
- $m =$ pendiente de la recta

Se calculó el porcentaje de inhibición del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ o DPPH ante la presencia de cada uno de los extractos mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(A^\circ_{\text{inicial}} - A^\circ_{\text{final}})}{(A^\circ_{\text{inicial}})} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

- A°_{inicial} : absorbancia del radical ajustado a la longitud de onda deseada.
- A°_{final} : absorbancia del radical más el extracto.

Se obtuvo el % de inhibición de las concentraciones conocidas (2-10 mg/mL) y mediante una regresión lineal se calculó el valor de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) expresada en mg/mL , que corresponde a la concentración de la muestra requerida para eliminar la radicalización al 50%, con la siguiente formula:

$$y = mx + b \quad (4)$$

Donde:

- $y =$ concentración para eliminar la radicalización al 50%
- $x =$ concentración inhibitoria 50 (CI_{50} mg/mL)

- b= ordenada al origen
- m= pendiente de la recta

Y finalmente se calculó el porcentaje de actividad antioxidante relativa (%AAR) para cada uno de los extractos comparada con la del ácido ascórbico utilizando la CI_{50} , mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ AAR} = \frac{CI_{50m}}{CI_{50r}} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

- CI_{50m} = concentración inhibitoria 50 de la muestra.
- CI_{50r} = concentración inhibitoria 50 del ácido ascórbico.

3.6 Ensayos para determinar el contenido de polifenoles totales y flavonoides de los extractos de *S. tigrina*

3.6.1 Ensayo de Folin-Ciocalteu para Contenido Fenólico Total (CFT)

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una combinación de molibdato y tungstato sódico el cual reacciona con cualquier tipo de fenol. El reactivo Folin-Ciocalteu se preparó al 10% y la solución de carbonato de calcio ($CaCO_3$) al 2%.

Para la cuantificación del CFT se preparó una concentración de 50 mg/mL de cada uno de los extractos. De la concentración conocida se tomaron 90 μ L por extracto y se le agregaron 180 μ L de la solución de Folin.Ciocalteu al 10% y 1 mL de la solución de $CaCO_3$ al 2%, la mezcla se incubó a 40 °C durante 1 h, finalmente se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. El blanco se preparó colocando 180 μ L de Folin-Ciocalteu al 10% y 90 μ L de agua destilada. Todas las mediciones se realizaron por triplicado para cada uno de los extractos (Figura 10) (Lugato *et al.*, 2014).

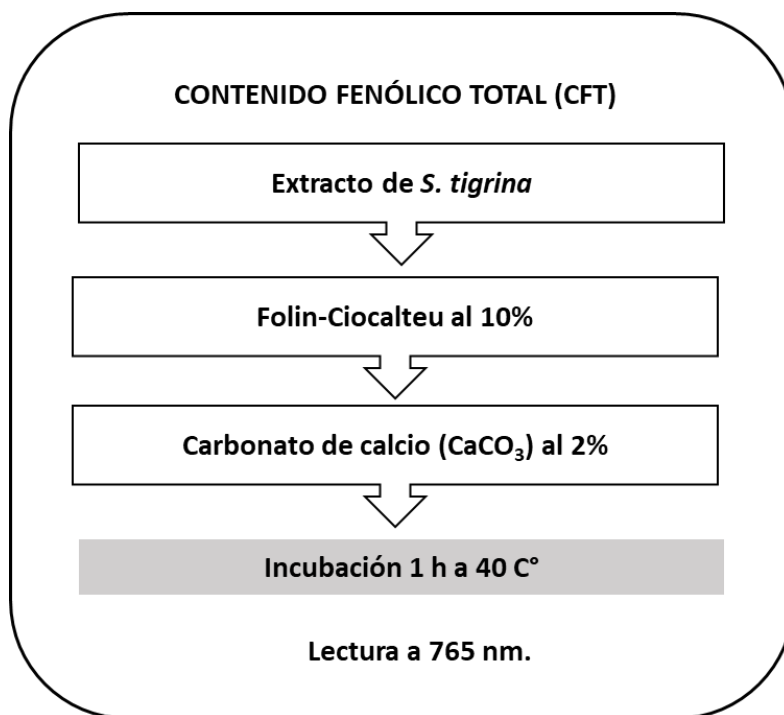


Figura 10. Proceso de cuantificación del CFT en extractos de *S. tigrina*.

El CFT se comparó con la solución estándar de ácido gálico (ANEXO V). Los resultados fueron expresados como Concentración Equivalente de Ácido Gálico (EAG $\mu\text{g/mL}$). Las absorbancias obtenidas de los extractos fueron interpoladas en la curva de calibración del ácido gálico mediante regresión lineal, utilizando la siguiente formula:

$$y = mx + b \quad (6)$$

Donde:

- $y = A^\circ$ del radical más el extracto
- $x =$ Concentración equivalente al ácido gálico (EAG $\mu\text{g/mL}$)
- $b =$ ordenada al origen
- $m =$ pendiente de la recta

3.6.2 Ensayo de tricloruro de aluminio (AlCl_3) para flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se preparó una solución de tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 10 %, una solución de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5% y una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M.

Se preparó una concentración de 50 mg/mL para cada extracto, de la concentración ya conocida se tomaron 500 μL del extracto y se le adicionaron 75 μL de NaNO_2 al 5%, después de 6 min se agregaron 150 μL de AlCl_3 al 10%, se dejó reposar durante cinco min y se adicionaron 500 μL de NaOH 1M. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 510 nm al tiempo cero y a los 30 min. Todas las lecturas se realizaron por triplicado para cada uno de los extractos (Figura 11) (Martínez-Vásquez, 2007).

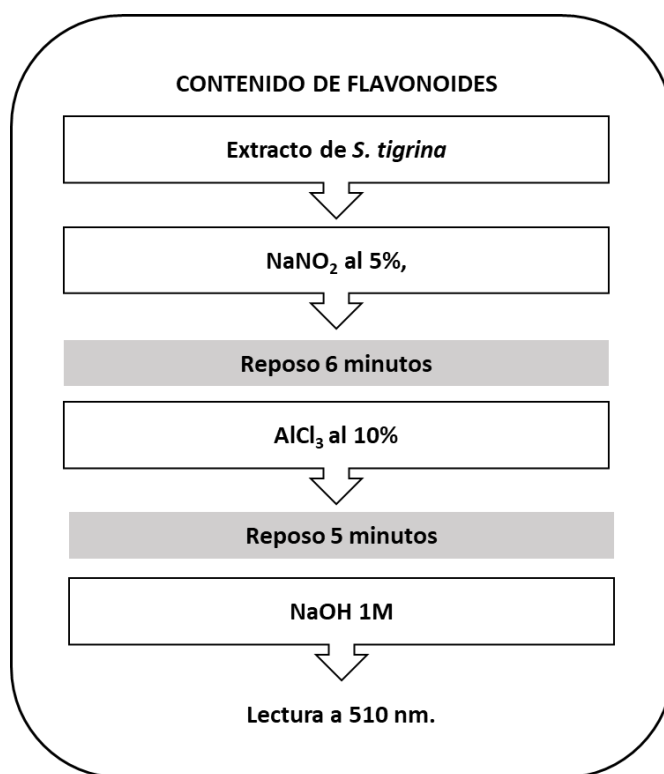


Figura 11. Proceso de cuantificación de flavonoides en extractos de *S. tigrina*.

El contenido de flavonoides presente en los extractos se comparó con la solución estándar de catequina (ANEXO VI). Los resultados fueron expresados como Concentración Equivalente de Catequina (CAT $\mu\text{g/mL}$). Las absorbancias obtenidas de los extractos fueron

interpoladas en la curva de calibración de catequina mediante regresión lineal, utilizando la siguiente formula:

$$y = mx + b \quad (7)$$

Donde:

- y = A° del radical más el extracto
- x = Concentración equivalente a catequina (CAT $\mu\text{g/mL}$)
- b = ordenada al origen
- m = pendiente de la recta

3.7 Biomodelo de experimentación para las pruebas farmacológicas: actividad ansiolítica, locomotora, hipnótica, sedante y efecto diurético de *S. tigrina*

Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones de acuerdo con lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001). Se trabajó con ratones Balb/c de seis semanas de edad, con un peso de 25 a 30 g, procedentes del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato campus Noria Alta. Los cuales se alojaron en jaulas acrílicas (29 x 17 x 15 cm de altura), tenían libre acceso al alimento y agua, se mantuvieron a 23 ± 2 °C, $55 \pm 5\%$ de humedad, con ciclos de luz y oscuridad de 12 h:12 h. El protocolo de este estudio fue revisado y aprobado por el comité de ética para la investigación de la Universidad de Guanajuato (CIBIUG-P48-2022).

3.8 Evaluación de toxicidad aguda DL_{50}

La toxicidad aguda de HE y PE se estimó según el protocolo de la OCDE, *Test No. 425: Acute Oral Toxicity*, los ratones fueron observados diariamente durante 14 d para registrar la mortalidad, los cambios de comportamiento y otros signos tóxicos (OECD, 2022).

3.9 Ensayos neurofarmacológicos para determinar la actividad ansiolítica, locomotora, hipnótica y sedante en extractos de *S. tigrina*

Los extractos de *S. tigrina* que obtuvieron una mayor actividad biológica en las pruebas antes mencionadas, son: PE y HE, los cuales se resuspendieron en solución salina (sodio=154mmol/L, cloro=154 mmol/L) a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/kg para las evaluaciones farmacológicas.

Para los ensayos neurofarmacológicos se formaron ocho grupos experimentales por ensayo, cada grupo experimental estuvo formado por ocho ratones Balb/c. Todos los tratamientos se administraron por vía oral. El grupo vehículo recibió 100 μ L de solución salina (sodio=154 mmol/L, cloruro =154 mmol/L), los grupos experimentales recibieron 10, 50 y 100 mg/kg de extractos de *S. tigrina* (PE y HE), el clonazepam (CNZ) a 1,5 mg/kg se administró al grupo control positivo en las pruebas de ansiolítico, locomotor, hipnótico y actividad sedante. Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Después de 60 min de cada administración de tratamiento, se realizó cada prueba de comportamiento (Figura 12).

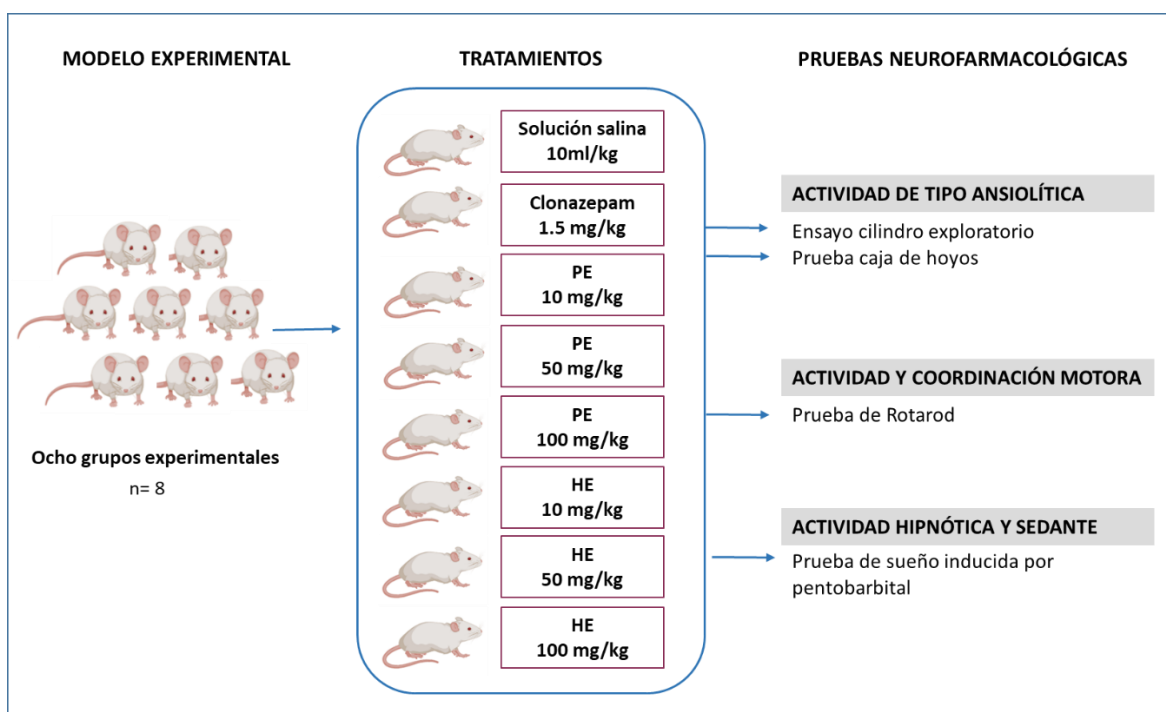


Figura 12. Modelo experimental para los ensayos neurofarmacológicos.

Para estos experimentos se utilizaron jaulas acrílicas experimentales (29 × 17 × 15 cm de altura), cilindro acrílico (45 cm de altura, 20 cm de diámetro, con una pared de 3 mm), rotarod (Panlab) y una caja de madera con 16 orificios de dos cm de diámetro (50 × 50 cm a 20 cm de altura).

3.9.1 Actividad de tipo ansiolítica

3.9.1.1. Ensayo de cilindro exploratorio

Los ratones se colocaron individualmente en un cilindro acrílico (45 cm de altura, 20 cm de diámetro, con una pared de 3 mm) con papel filtro e iluminación constante. Se registró el número de levantamientos del ratón sobre sus patas traseras cerca de la periferia o apoyados sobre la pared del cilindro, las observaciones se realizaron durante 5 min.

Los resultados se expresaron en frecuencias de levantamientos y se obtuvieron estadísticas básicas descriptivas, media y error estándar de la media ($\text{Media} \pm \text{EEM}$). Una disminución del número de levantamientos y un aumento del tiempo en el área central del cilindro sugieren un menor estado de ansiedad, debido a que el área central es considerada más amenazante que la periferia.

Para obtener la dosis efectiva 50 (DE_{50}) los resultados se expresaron como actividad de tipo ansiolítico (%), la cual se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de tipo ansiolítico (\%)} = \frac{(R_c - R_t)}{R_c} \times 100 \quad (8)$$

Dónde:

R_c = Media de levantamientos en ratones del grupo de vehículo

R_t = Media de levantamientos en ratones tratados con diferentes dosis del extracto.

La actividad de tipo ansiolítico (%) se representó en el eje y, mientras que la dosis logarítmica (10, 50 y 100 mg/kg) se representó en el eje x. Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron mediante análisis de regresión lineal para obtener la dosis efectiva 50 (DE_{50}).

3.9.1.2. Prueba de caja de hoyos

Los ratones se colocaron de manera individual en la caja de madera con 16 orificios de dos cm de diámetro (50×50 cm a 20 cm de altura), después de haber transcurrido 60 min desde la administración vía oral de los tratamientos de *S. tigrina*. Se registró el número de veces que el ratón introduce la cabeza en los agujeros hasta por lo menos el nivel de las orejas, las observaciones se realizaron en un lapso de cinco min.

Los resultados se expresaron en frecuencias de exploraciones en los orificios y se obtuvieron estadísticas básicas descriptivas, como: media y error estándar de la media (Media $\pm$ EEM). El aumento en el número de exploraciones en los orificios sugiere un menor estado de ansiedad.

Para obtener la dosis efectiva 50 (DE₅₀) los resultados se expresaron como actividad de tipo ansiolítico (%), la cual se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de tipo ansiolítico (\%)} = \frac{(Rc - Rt)}{Rc} \times 100 \quad (9)$$

Dónde:

Rc = Media de las exploraciones en los orificios de los ratones del grupo de vehículo.

Rt = Media de las exploraciones en los orificios de los ratones tratados con diferentes dosis del extracto.

La actividad de tipo ansiolítico (%) se representó en el eje y, mientras que en el eje x se representó la dosis logarítmica (10, 50 y 100 mg/kg). Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron mediante análisis de regresión lineal para obtener la dosis efectiva 50 (DE₅₀).

3.9.1.3. Mecanismo de acción de la actividad ansiolítica

En la prueba de antagonismo se utilizaron tres grupos de ratones, cada grupo integrado por ocho ratones. Se les administraron fármacos inhibidores de la actividad de tipo ansiolítica, vía intraperitoneal, al grupo uno se les administró 100 μ L de Flumazenil 1mg/kg, al grupo dos 100 μ L de Prazosina 0.5 mg/kg y al tercer grupo 100 μ L de Ketanserina 1 mg/kg. Transcurridos 15 min se les administró a los tres grupos 100 μ L del extracto HE de *S. tigrina* 100 mg/kg, 45 min después se colocaron en la caja de hoyos. Se registró el número de veces que el ratón introduce la cabeza en los orificios hasta por lo menos el nivel de las orejas las observaciones se realizaron por un lapso de cinco min (Figura 13).

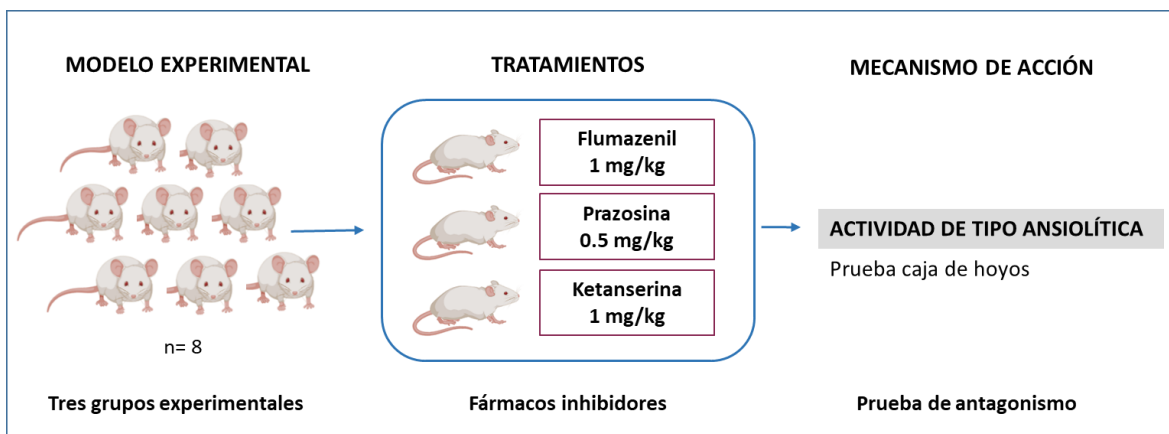


Figura 13. Mecanismo de acción de la actividad ansiolítica.

Los resultados se expresaron en frecuencias de exploraciones en los orificios y se graficaron estadísticas básicas descriptivas: media y error estándar de la media (media $\pm$ EEM) las cuales se compararon con los resultados del grupo vehículo y el grupo de ratones que obtuvo una mayor actividad ansiolítica con el extracto de 100 mg/kg de HE.

3.9.2 Actividad y coordinación motora

3.9.1.4. Prueba de Rotarod/varilla giratoria

Se realizó un entrenamiento previo durante tres días en el cual se midió el tiempo que duraban los ratones en el rotarod. Para el ensayo se seleccionaron ratones capaces de caminar sobre la varilla giratoria a 4 rpm durante 4 min. Los ratones se evaluaron individualmente en función del tiempo que pasaron en la varilla giratoria a los 60 y 120 min después del tratamiento.

Los resultados se expresaron en estadísticas básicas descriptivas, media y error estándar de la media (Media $\pm$ EEM) del tiempo que pasaron sobre el rotarod/varilla giratoria a 4 rpm. Una disminución del tiempo en el rotarod sugiere la pérdida de la actividad y coordinación motora.

3.9.3 Actividad hipnótica y sedante

3.9.1.5. Prueba de sueño inducida por pentobarbital

Después de la administración de los tratamientos, todos los grupos de ratones recibieron 40 mg/kg de pentobarbital vía intraperitoneal. Después de la administración de pentobarbital, los ratones se colocaron individualmente en jaulas acrílicas. El inicio del sueño se tomó como el intervalo desde la inyección intraperitoneal de pentobarbital hasta la pérdida del reflejo de

enderezamiento (cuando un ratón pueda colocarse sobre su espalda), mientras que la duración del sueño se tomó como el intervalo desde la pérdida del reflejo de enderezamiento hasta que recuperó el reflejo del enderezamiento.

Los resultados del tiempo de latencia y de la duración del sueño, se expresaron con estadísticas básicas descriptivas, media y error estándar de la media ($\text{Media} \pm \text{EEM}$). Cuando el ansiolítico acorta el periodo de latencia sugiere actividad hipnótica, mientras que si se prolonga la duración del sueño sugiere actividad sedante.

3.10 Ensayo para medir el efecto diurético de los extractos obtenidos de *S. tigrina*

Para el ensayo de efecto diurético se formaron ocho grupos experimentales por ensayo, cada grupo experimental estuvo formado por ocho ratones Balb/c. Los animales se mantuvieron sin comida y sin agua en las 18 h previas al inicio del experimento y durante las seis h de recolección de la orina. Todos los tratamientos se administraron por vía oral. El grupo vehículo recibió 100 μL de solución salina (sodio=154 mmol/L, cloruro =154 mmol/L), los grupos experimentales recibieron 10, 50 y 100 mg/kg de extractos de *S. tigrina* (PE y HE) resuspendidos en solución salina (sodio=154mmol/L, cloro=154 mmol/L), y el grupo control positivo 10 mg/kg de furosemida (FUR). Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Después de 45 min de la administración de los tratamientos, se les administro vía oral un volumen de 10 mL/kg del peso corporal del animal de solución salina (sodio=154mmol/L, cloro=154 mmol/L) y se colocaron en la jaula metabólica de manera individual (Figura 14).

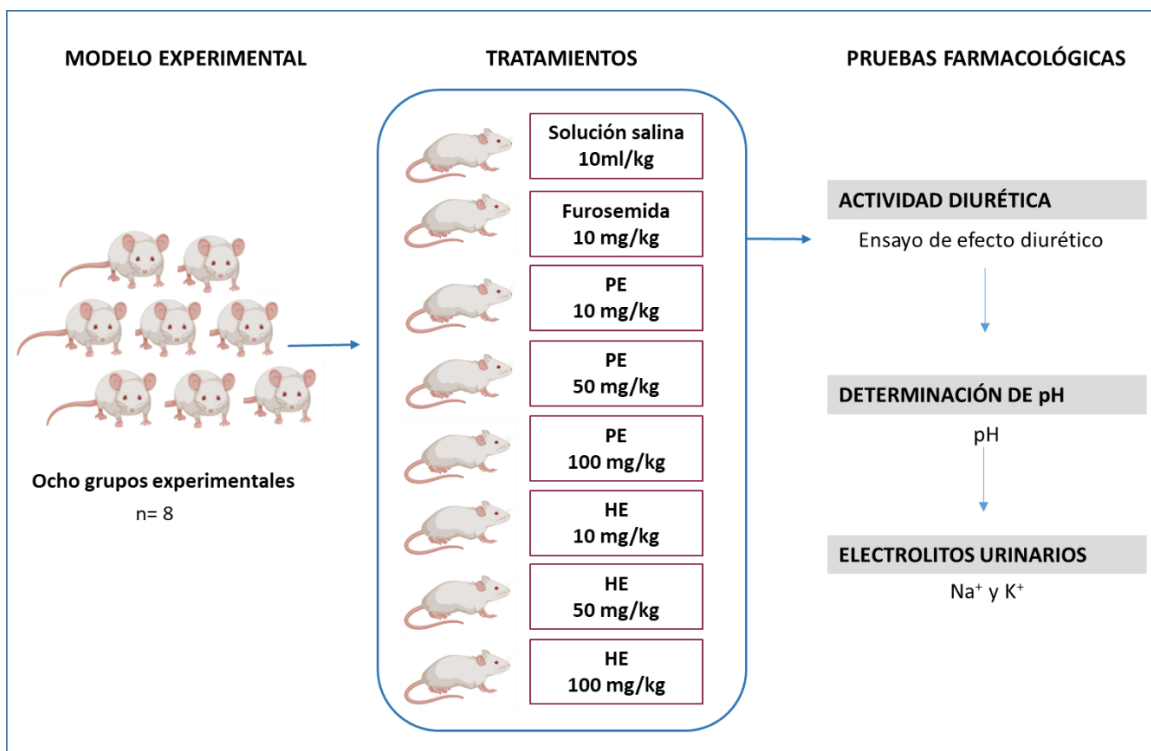


Figura 14. Modelo experimental para la evaluación del efecto diurético.

La orina se recolectó durante seis h en jaulas metabólicas a una temperatura ambiente de 23 ± 2 °C, la orina excretada se midió a las 6 h después de la administración. Se midieron los valores de pH, y las concentraciones de electrolitos urinarios (Na⁺ y K⁺) con la técnica de ion selectivo.

Para este ensayo se utilizaron jaulas metabólicas (15 × 15 × 15 cm. Altura total: 30 cm), micropipetas DLAB® 10-100 µL y 100-1000 µL, microtubos de 1.5 mL. (Eppendorf Quality™) y analizador de electrolitos (modelo Nova 10, marca Biomedical).

3.10.1 Mecanismo de acción para el efecto diurético

Para determinar el mecanismo de acción se utilizaron dos grupos, cada grupo integrado por ocho ratones. La administración de los fármacos inhibidores se realizó vía intraperitoneal. A un grupo se les administraron 100 µL del fármaco L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa), mientras que al segundo grupo se les administraron 100 µL del fármaco Indometacina (inhibidor de prostaglandinas), transcurridos 15 min se les administró vía oral 100 µL del extracto EH en una dosis de 100 mg/kg. Posteriormente, pasados 45 min se les

administro vía oral 10 mL/kg de solución salina (sodio=154mmol/L, cloro=154 mmol/L). La orina se recolectó en una jaula metabólica, y la producción acumulada de orina se midió a las 6 h después de la administración. Los resultados fueron expresados con estadísticas básicas descriptivas, media y error estándar de la media ($\text{Media} \pm \text{EEM}$) (Figura 15).

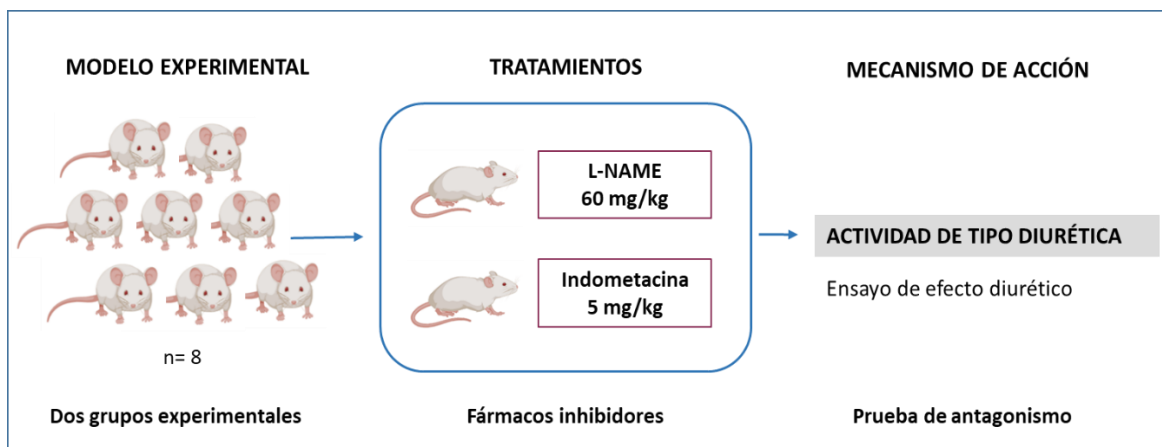


Figura 15. Mecanismo de acción del efecto diurético.

3.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre la evaluación de la capacidad antioxidante, la actividad ansiolítica y el efecto diurético fueron analizados mediante una prueba de normalidad (Test de Shapiro–Wilk) para conocer el comportamiento de los datos. Posteriormente se realizaron bases de datos con estadísticos básicos descriptivos (media, desviación y error estándar de la media).

Los resultados de los ensayos de capacidad antioxidante: ABTS y DPPH, el contenido total de polifenoles, contenido de flavonoides y efecto diurético, fueron analizados por una ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey, para un nivel de confianza del 95% ($p<0.05$), para conocer las diferencias significativas entre tratamientos. Mientras que los resultados de los ensayos neurofarmacológicos: actividad tipo ansiolítica, locomotora, hipnótica y sedante se analizaron por una ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Dunnett, para un nivel de confianza del 95% ($p<0.05$), para conocer las diferencias significativas entre el grupo vehículo y los tratamientos.

Los análisis estadísticos y gráficos realizados en el presente trabajo fueron elaborados en el programa estadístico GraphPad Prism versión 8.0.2 (2019).

IV. RESULTADOS

S. tigrina es una orquídea reconocida por su valor ornamental, sin embargo, su potencial en la medicina tradicional ha despertado un creciente interés debido a su uso ancestral en el tratamiento de diversos trastornos, incluidos los relacionados con la salud mental y renal. En este contexto, el presente estudio se centró en investigar las propiedades medicinales tanto de vitroplantas como de plantas silvestres de *S. tigrina*, con el objetivo de comparar su potencial terapéutico, y evaluar el impacto del cultivo *in vitro* en la actividad medicinal de esta especie. Los resultados obtenidos ofrecen una perspectiva única sobre la efectividad y la consistencia de las propiedades ansiolíticas y diuréticas de esta orquídea, proporcionando así información interesante para la aplicación clínica y el desarrollo futuro de terapias. A continuación, se presentan los resultados obtenidos, destacando las similitudes y diferencias entre las vitroplantas y las plantas silvestres, así como las implicaciones de estos resultados para la medicina tradicional y la investigación farmacéutica.

4.1 Estudio etnobotánico

Se visitaron los tianguis de los municipios de Xilitla, Aquismón y Tamasopo, pertenecientes a la región de la Huasteca Potosina. Xilitla está habitada principalmente por la etnia náhuatl, mientras que los municipios de Aquismón y Tamasopo están habitados por los grupos tenek y pames, respectivamente. Estos grupos étnicos viven en comunidades con un alto grado de marginación, difícil acceso y pocos o ningún servicio de salud pública. Los fines de semana los habitantes acuden a las cabeceras municipales a vender sus productos, entre ellos *S. tigrina*. La orquídea se vende por su uso medicinal en trastornos mentales y trastornos urológicos. En la entrevista participaron un total de 22 personas, el 72% de los informantes correspondió al género femenino y el 28% al género masculino, con una edad promedio de 37,9 años para las mujeres y 49,6 años para los hombres. La principal ocupación de mujeres y hombres fue el comercio y la agricultura, respectivamente. Todos los participantes tenían un nivel básico de educación.

Del total de personas entrevistadas, el 31,81% utiliza *S. tigrina* como planta medicinal y el 68,18% como planta ornamental. Con un índice de nivel de uso significativo, TRAMIL = 32%, valor que puede considerarse significativo para la aceptación cultural (Figura 16).

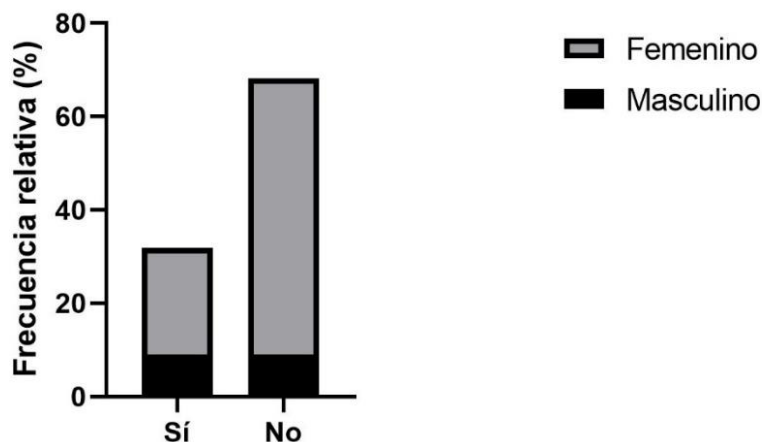


Figura 16. Estudio etnobotánico sobre el uso de *S. tigrina* como planta medicinal.

Los usos medicinales o fines mágico-religiosos mencionados fueron los siguientes: tranquilizante/nerviosismo (57,14%), mal de ojo (28,57%) y enfermedades renales/urológicas (14,29%). Hojas (71,43%), pseudobulbo (14,29%) y planta completa (14,29%) fueron los órganos vegetales utilizados en el preparado medicinal de *S. tigrina*.

De acuerdo con el estudio etnobotánico, las hojas de *S. tigrina* se utilizan como tranquilizante para crisis nerviosas y/o ansiedad, mientras que el pseudobulbo de esta orquídea se utiliza para enfermedades relacionadas con los riñones. La prueba X^2 mostró diferencias significativas entre los órganos de *S. tigrina* utilizados por el municipio, $X^2 = 23.818$, $gl = 3$ y $p < 0.001$ (Figura 17).

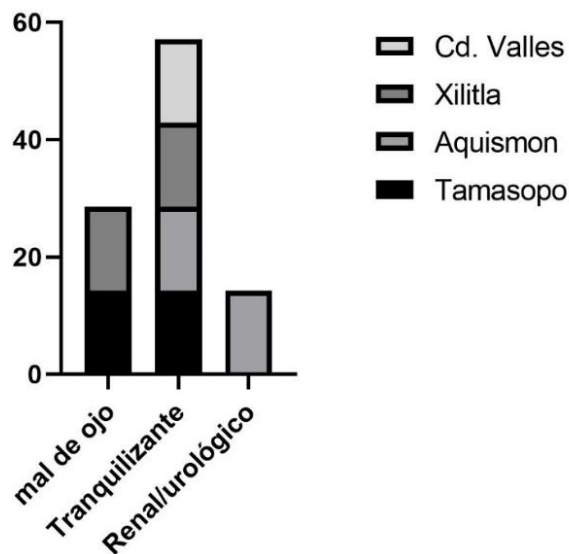


Figura 17. Estudio etnobotánico: usos o fines mágico-religiosos de *S. tigrina* por municipio.

La especie se obtiene en un 71.43% mediante recolección y un 28,57% mediante cultivo de traspatio. Los informantes mencionaron que la forma de preparación de la orquídea es mediante decocción y su forma de administración es vía oral.

Por ello, para el presente estudio se realizaron extractos de los dos órganos mencionados (pseudobulbo y hoja) de la orquídea *S. tigrina*. También se tomó en cuenta la forma de preparación utilizada y se realizaron extracciones mediante decocción tanto para hoja como para pseudobulbo, así también para una mayor evaluación farmacológica se realizó la extracción asistida por microondas (EAM).

4.1.1 Recolecta *in situ* de *S. tigrina* silvestre

La colecta se realizó en Barrio de Jolja, Tampaxal, Aquismón, perteneciente al estado de San Luis Potosí, México; en las coordenadas 21°31'44.8"N 99°03'27.8"W, a una altitud de 818 msnm el 18 de septiembre del 2020. Los ejemplares se encontraron posados sobre *Sambucus canadiensis* y sobre rocas sedimentarias calizas cubiertas de musgo (Figura 18). Se recolectaron cinco ejemplares, uno de ellos fue depositado en el herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas con número de registro: 62290.



Figura 18. *Stanhopea tigrina* in situ.

4.1.2 Resiembra de vitroplantas de *S. tigrina*

Los lotes de resiembras de vitroplantas de *S. tigrina* obtuvieron un promedio de crecimiento de 3.32 ± 0.40 cm en el transcurso de 20 semanas (Figura 19).

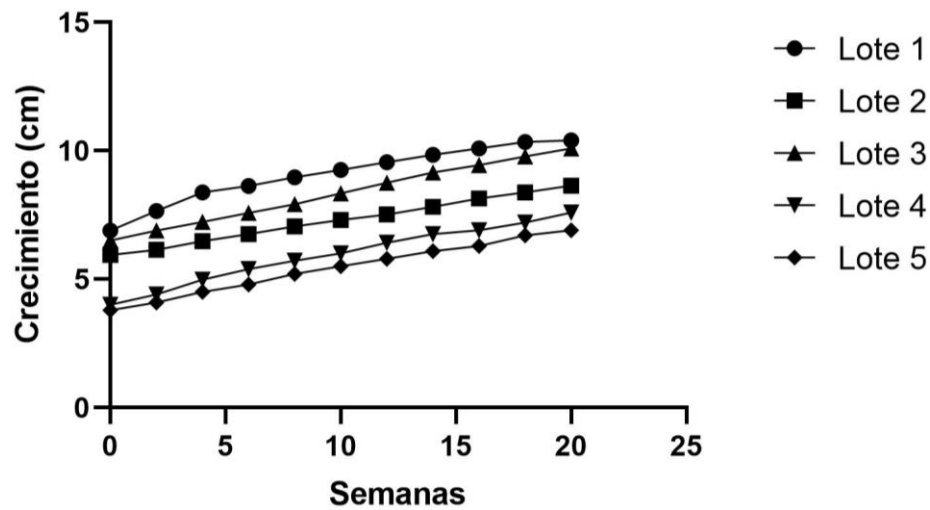


Figura 19. Crecimiento de las resiembras de vitroplantas de *S. tigrina*.

El promedio inicial de hojas por frasco fue de 6.8 ± 1.78 , mientras que la media del número de hojas nuevas fue de 3.6 ± 1.51 por frasco, obteniendo como resultado una media de hojas final de 8.4 ± 2.50 por frasco (Tabla 5).

Tabla 5. *Resiembra de vitroplantas de S. tigrina por lote.*

Resiembras	Crecimiento		Número de hojas por frasco				Número de raíces por frasco		
	Inicial (cm)	Final (cm)	Inicial	Oxidadas	Nuevas	Final	Inicial	Oxidadas	Final
Medio MS, sacarosa, carbón activado y agar									
Lote 1	6.8	10.4	5	3	2	4	5	2	3
Lote 2	5.9	8.6	5	0	4	9	7	0	8
Lote 3	10.1	6.5	7	2	5	10	3	0	3
Lote 4	4	7.6	9	2	2	9	5	3	2
Lote 5	3.8	6.9	8	3	5	10	6	3	3

Por otra parte, se presentó contaminación de levaduras y hongos en el lote 1 de las vitroplantas de *S. tigrina*, mientras que en el lote 3 la contaminación solamente fue causada por hongos, y los lotes 2, 4 y 5 no presentaron contaminación. Se observó oxidación de hojas y raíces en los lotes 1, 3, 4 y 5, mientras que en el lote 2 no se observó oxidación de hojas o raíces (Tabla 6).

Tabla 6. *Contaminación en las resiembra de vitroplantas de S. tigrina.*

Resiembras	Contaminación				Oxidación			
	0%	Levaduras	Bacterias	Hongos	0%	+	++	+++
Lote 1	-	x	-	x	-	-	X	-
Lote 2	x	-	-	-	X	-	-	-
Lote 3	-	-	-	x	X	-	-	-

Lote 4	X	-	-	-	-	X	-	-
Lote 5	X	-	-	-	-	X	-	-

4.2 Tamizaje fitoquímico cualitativo

Se encontró la presencia de alcaloides, sesquiterpenlactonas, flavonoides, cumarinas, oxhidrilos fenólicos y glucosidos cardiacos en los extractos PE, PA, HE, HA y IE. Los extractos PE, HE y HA presentaron una mayor intensidad de coloración en flavonoides y los extractos PE, HE, HA e IE una mayor precipitación en oxhidrilos fenólicos (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos etanólico y acuoso de *S. tigrina*.

Prueba fitoquímica cualitativa	Control +	PE	PA	HE	HA	IE
Alcaloides – Prueba de Mayer	Cafeína	+	+	+	+	-
Alcaloides – Prueba de Wagner	Cafeína	+	+	+	+	+
Terpenos – Reacción Lieberman-Burchard	Aceite de almendra	-	-	-	-	-
Insaturaciones – KMnO₄ 2%	Aceite de oliva	-	-	-	-	-
Sesquiterpenlactonas	Apio	+	+	+	+	+
Flavonoides – flavonas	Guayaba	++	+	++	++	+
Flavonoides - prueba de Shinoda	Guayaba	+	+	+	+	+
Esteroles - Prueba de Salkowski	Yuca	-	-	-	-	-
Cumarinas – Prueba de NaOH	Canela	+	+	+	+	+
Oxhidrilos fenólicos	Precipitado rojo azul	++	+	+++	++	+
Glucósidos cardiacos – Prueba Keller Killiani	Anillo violeta y café	+	+	+	+	+
Saponinas – Índice de espuma	Espuma	-	-	-	-	-

4.3 Ensayos para determinar capacidad antioxidante de los extractos de *S. tigrina*

4.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* por ABTS

Por el método ABTS el extracto HE presentó la actividad antioxidante más alta con una concentración equivalente a 200.73 ± 0.59 mg de Ácido Ascórbico (AA) por cada 100 g de *S. tigrina* ($p < 0.05$), con un valor de Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 3.53 mg/mL para ABTS (Tabla 8). Seguido del extracto PE con una concentración equivalente a 161.55 ± 1.76 mg de Ácido Ascórbico (AA) por cada 100 g de *S. tigrina* ($p < 0.05$), y una CI₅₀ de 4.57 mg/mL en ABTS. Todos los extractos presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Tukey (Figura 20).

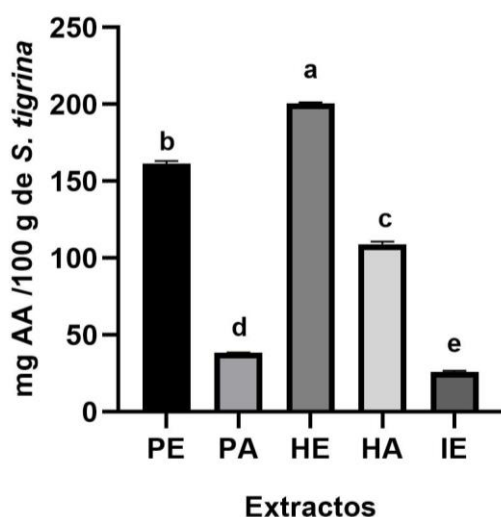


Figura 20. Capacidad antioxidante *in vitro* ABTS en extractos de *S. tigrina*. Media $\pm$ SD, ANOVA con test post hoc de Tukey. PE: Pseudobulbo Etanólico, PA: Pseudobulbo Acuoso, HE: Hoja Etanólico, HA: Hoja acuoso e IE: In vitro etanólico. $p < 0.05$ comparación múltiple.

Los extractos que mostraron la mejor actividad antioxidante relativa (%AAR) mediante ABTS fueron HE y PE, con valores de 2.94 % y 3.81 %, respectivamente; comprobando que estos extractos exhiben una mayor actividad biológica (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) y porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa (%AAR) mediante ABTS de los extractos de *S. tigrina*.

Extracto	CI_{50} mg/mL	% AAR
PE	4.57	3.81
PA	18.12	15.08
HE	3.53	2.94
HA	6.53	5.44
IE	6.53	23.11
AA	0.12	---

PE: Pseudobulbo Etanólico, PA: Pseudobulbo Acuoso, HE: Hoja Etanólico, HA: Hoja acuoso, IE: *In vitro* etanólico y AA: ácido ascórbico.

4.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* por DPPH

En la prueba confirmatoria de actividad antioxidante DPPH, el extracto HE presentó la actividad antioxidante más alta con una concentración equivalente a 113.49 ± 0.17 mg de Ácido Ascórbico (AA) por cada 100 g de *S. tigrina* ($p < 0.05$), con un valor de CI_{50} de 0.39 mg/mL en DPPH (Tabla 9). El extracto PE mostró una concentración equivalente a 110.12 ± 0.90 mg de Ácido Ascórbico (AA) por cada 100 g de *S. tigrina* ($p < 0.05$), y una CI_{50} de 3.04 mg/mL en ABTS. Todos los extractos presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Tukey (Figura 21).

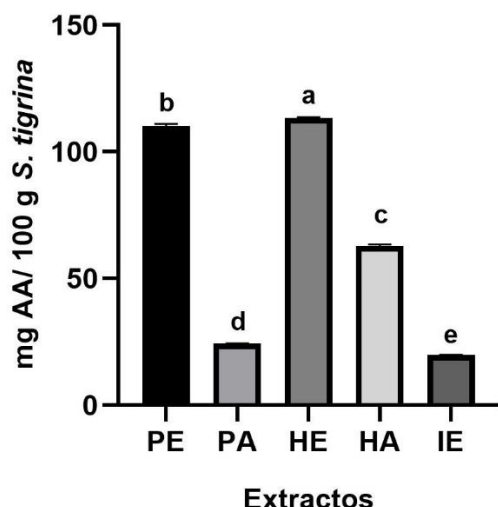


Figura 21. Capacidad antioxidante in vitro DPPH en extractos de *S. tigrina*. Media $\pm$ SD, ANOVA con test post hoc de Tukey. PE: Pseudobulbo Etanólico, PA: Pseudobulbo Acuoso, HE: Hoja Etanólico, HA: Hoja acuoso e IE: In vitro etanólico. $p < 0.05$ comparación multiple.

Los extractos que mostraron la mejor actividad antioxidante relativa (%AAR) fueron HE y PE, con valores de 0.66 % y 5.09 %, respectivamente; comprobando que estos extractos exhiben una mayor capacidad de captar los radicales libres (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) y porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa (%AAR) mediante DPPH de los extractos de *S. tigrina*.

Extracto	CI_{50} mg/mL	% AAR
PE	3.04	5.09
PA	16.98	28.36
HE	0.39	0.66
HA	7.54	12.60
IE	21.35	35.67
AA	0.59	---

PE: Pseudobulbo Etanólico, PA: Pseudobulbo Acuoso, HE: Hoja Etanólico, HA: Hoja acuoso, IE: In vitro etanólico y AA: ácido ascórbico.

4.4 Ensayos para determinar el contenido de polifenoles totales y flavonoides de los extractos de *S. tigrina*

4.4.1 Cuantificación del Contenido Fenólico Total (CFT)

El extracto HE mostró un mayor contenido de polifenoles totales con una concentración equivalente de 23.17 ± 0.02 mg de ácido gálico (GA) por cada 100 g de *S. tigrina*, seguido del extracto PE que mostró 17.45 ± 0.03 mg equivalentes al GA por cada 100 g de *S. tigrina*. Todos los extractos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 22).

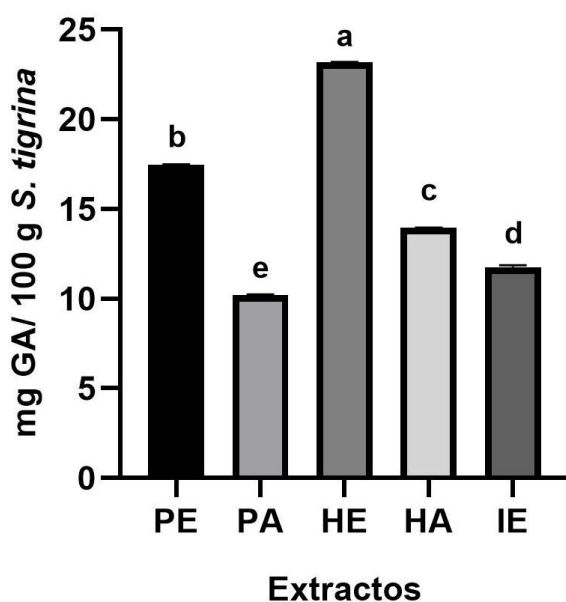


Figura 22. Contenido de polifenoles totales en extractos de *S. tigrina*. Media $\pm$ SD, ANOVA con prueba post hoc de Tukey $p < 0.05$ comparación múltiple. PE: Pseudobulbo Etanólico, PA: Pseudobulbo Acuoso, HE: Hoja Etanólico, HA: Hoja acuoso e IE: In vitro etanólico.

4.4.2 Cuantificación de flavonoides totales

El extracto HE mostró un alto contenido de flavonoides con una concentración equivalente a 391.54 ± 0.53 mg de catequina (CAT) por cada 100 g de *S. tigrina*, seguido del extracto IE con 215.49 ± 0.42 mg de CAT por cada 100 g de *S. tigrina*. PA mostró la actividad antioxidante más baja con 60.17 ± 0.19 mg de CAT por cada 100 g de *S. tigrina*. Todos los extractos mostraron diferencias significativas en la comparación múltiple ($p < 0.05$) (Figura 23).

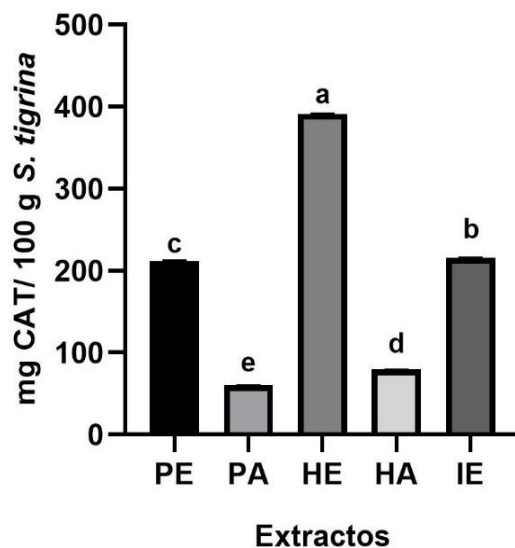


Figura 23. Contenido de flavonoides en extractos de *S. tigrina*.
Media $\pm$ SD, ANOVA con prueba post hoc de Tukey $p < 0.05$ comparación multiple.
PE: Pseudobulbo Etanólico, PA: Pseudobulbo Acuoso, HE: Hoja Etanólico, HA: Hoja acuoso e IE: In vitro etanólico.

4.4.3 Correlación entre actividad antioxidante con polifenoles y flavonoides

Se realizó una prueba de Pearson para conocer las correlaciones entre la actividad antioxidante total (ABTS y DPPH) con el contenido de polifenoles totales y flavonoides. Se observó una correlación positiva entre la actividad antioxidante total y el contenido de polifenoles y flavonoides, con un valor de $r^2 = 0.94$ entre ABTS y polifenoles (Figura 24), una $r^2 = 0.66$ entre ABTS y flavonoides (Figura 25), $r^2 = 0.91$ entre DPPH y polifenoles (Figura 26) y $r^2 = 0.63$ entre DPPH y flavonoides (Figura 27). Indicando que a mayor concentración de compuestos fenólicos y contenido de flavonoides se presenta una mayor actividad biológica.

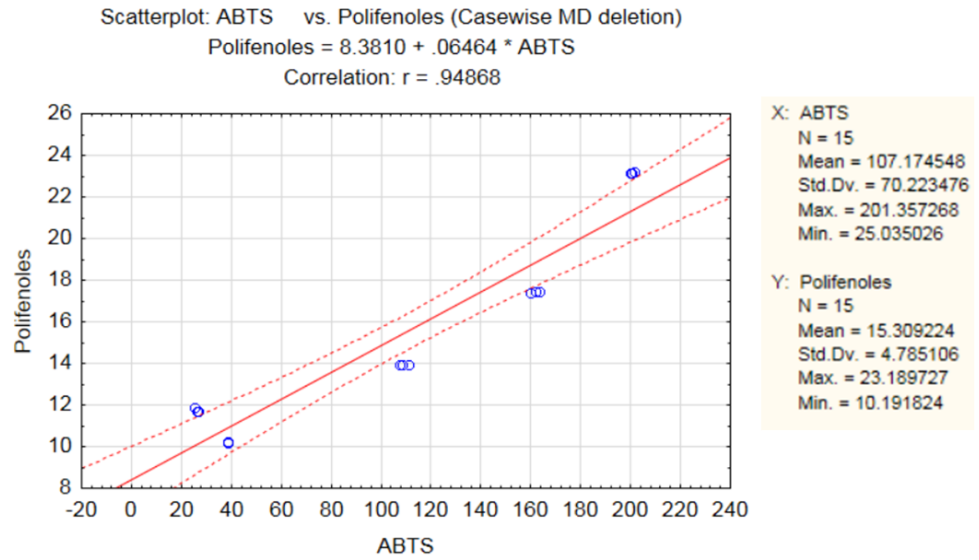


Figura 24. Correlación de Pearson entre ABTS y CFT.

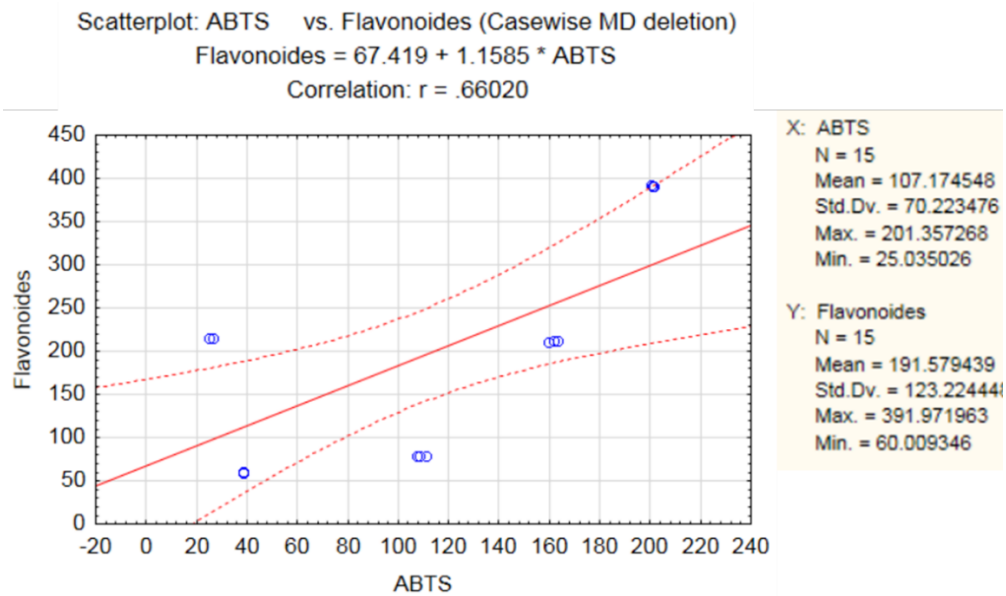


Figura 25. Correlación de Pearson entre ABTS y flavonoides.

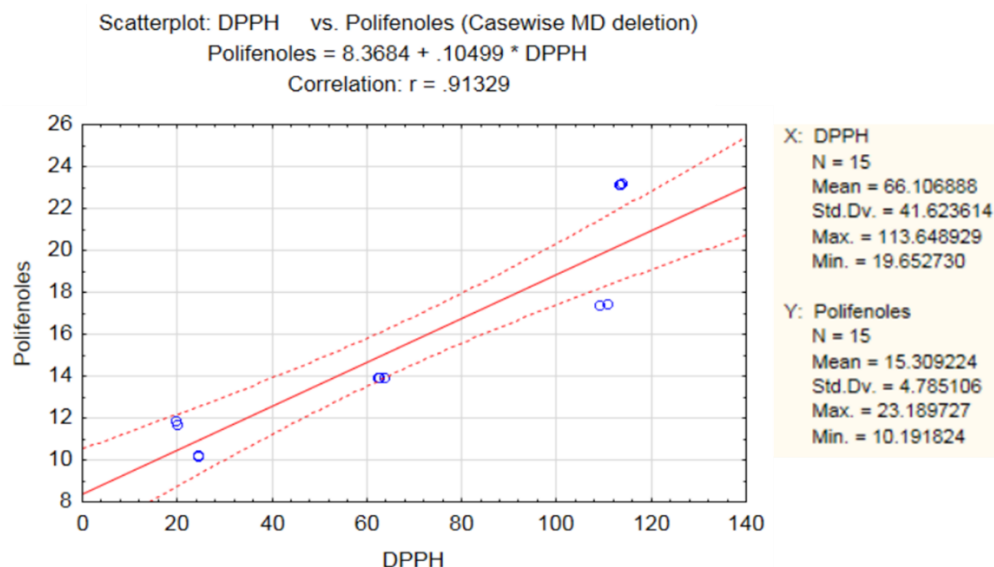


Figura 26. Correlación de Pearson entre DPPH) y CFT.

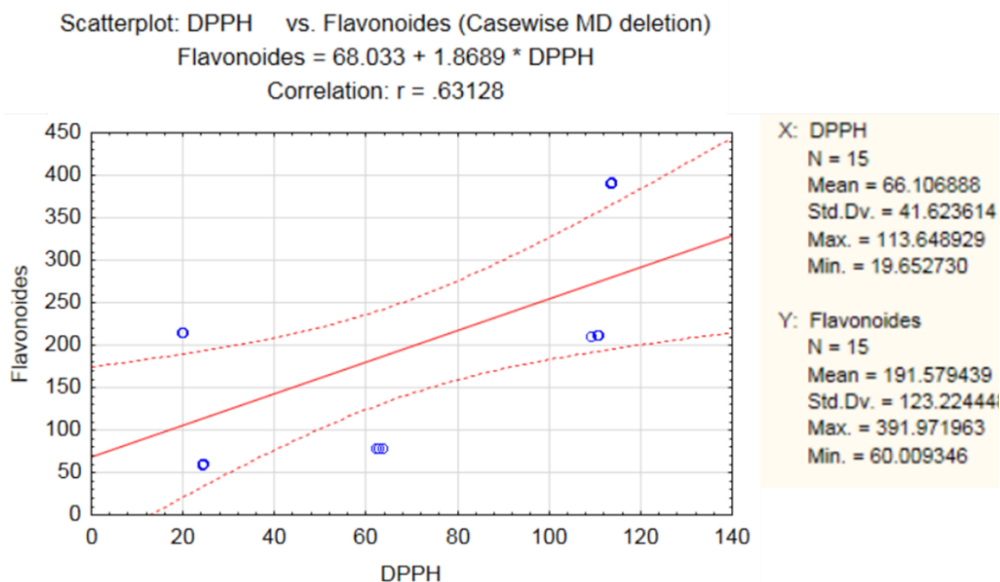


Figura 27. Correlación de Pearson entre DPPH y flavonoides.

Los extractos PE y HE mostraron una mayor actividad biológica en el tamizaje fitoquímico, en las pruebas de actividad antioxidante total (ABTS y DPPH), en el CFT y el contenido de flavonoides. Por lo tanto, PE y HE fueron los extractos utilizados en las pruebas farmacológicas.

4.5 Evaluación de toxicidad aguda DL₅₀

La toxicidad aguda reveló que ambos extractos presentaron valores de DL₅₀ superiores a 2000 mg/kg v.o.; no se apreciaron signos visibles de toxicidad en los ratones y no se observaron signos visibles de toxicidad en el hígado, los pulmones, el corazón, los intestinos y la vejiga.

4.6 Actividad ansiolítica, locomotora, hipnótica y sedante de los extractos de *S. tigrina*

4.6.1 Ensayo de cilindro exploratorio

Los tratamientos PE y HE mostraron diferencias significativas con el vehículo ($p < 0,05$). Se observa una reducción en el número de levantamientos, con un efecto dosis-dependiente de tipo ansiolítico, en HE 36.79, 54.95 y 60.92% y en PE 30.7, 35.7 y 46.8%, respectivamente. Esto indica que los tratamientos tienen efectos ansiolíticos similares a los del CNZ (1.5 mg/kg). El CNZ reduce el número de elevaciones en el cilindro exploratorio, lo que indica un menor estado de ansiedad (Figura 28).

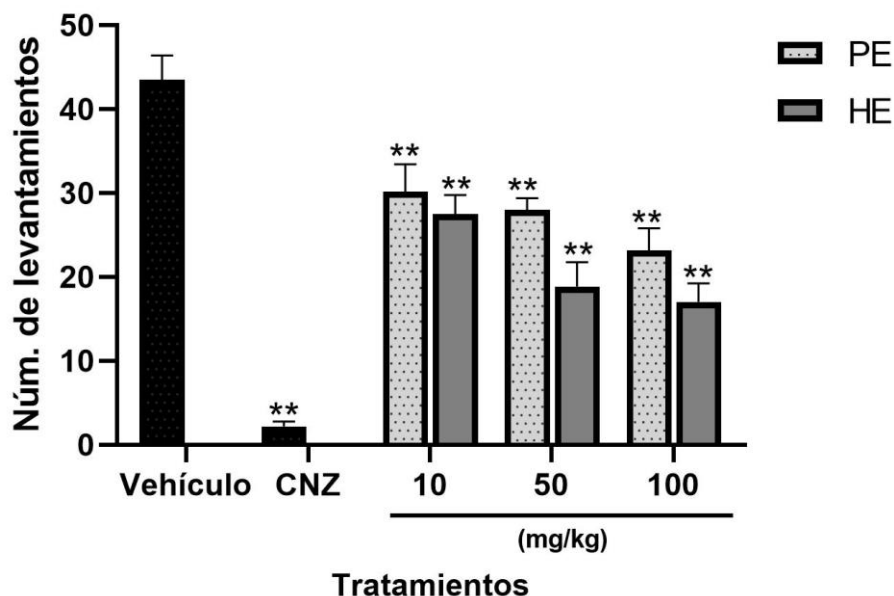


Figura 28. Cilindro exploratorio con los tratamientos de *S. tigrina*. Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba Post hoc de Dunnet. PE: *Pseudobulbo Etanólico*, HE: *Etanólico de Hoja*, CNZ: *Clonazepam* y Vehículo: *solución salina*. $^{**}p < 0.05$ comparación con el grupo vehículo.

La dosis efectiva 50 (DE_{50}) para el extracto HE fue de 49.34 mg/kg, dosis que produce la respuesta farmacológica deseada en el 50% de la población (Figura 29).

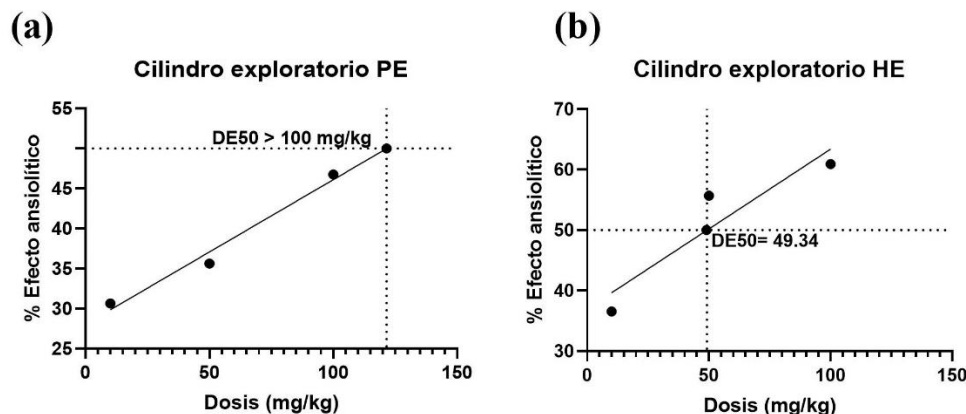


Figura 29. Curvas dosis-respuesta DE_{50} para efecto ansiolítico por el ensayo cilindro exploratorio.

4.6.2 Ensayo de caja/tablero de hoyos

El número de inmersiones de cabeza en la caja de hoyos registrado en los tratamientos HE de 50 y 100 mg/kg presenta diferencias significativas en comparación con el grupo de vehículo ($p < 0.05$). El CNZ 1.5 mg/kg aumenta el número de exploraciones en el tablero, lo que indica un menor estado de ansiedad. El efecto ansiolítico mostrado por el extracto HE fue del 40.89 y 96%, respectivamente. Esto indica que los tratamientos presentan actividad ansiolítica como la mostrada por CNZ. PE en dosis de 10, 50 y 100 mg/kg y 10 mg/kg de HE no mostraron ($p > 0.05$) efectos ansiolíticos significativos. Se observó que HE presenta una actividad dosis dependiente (Figura 30).

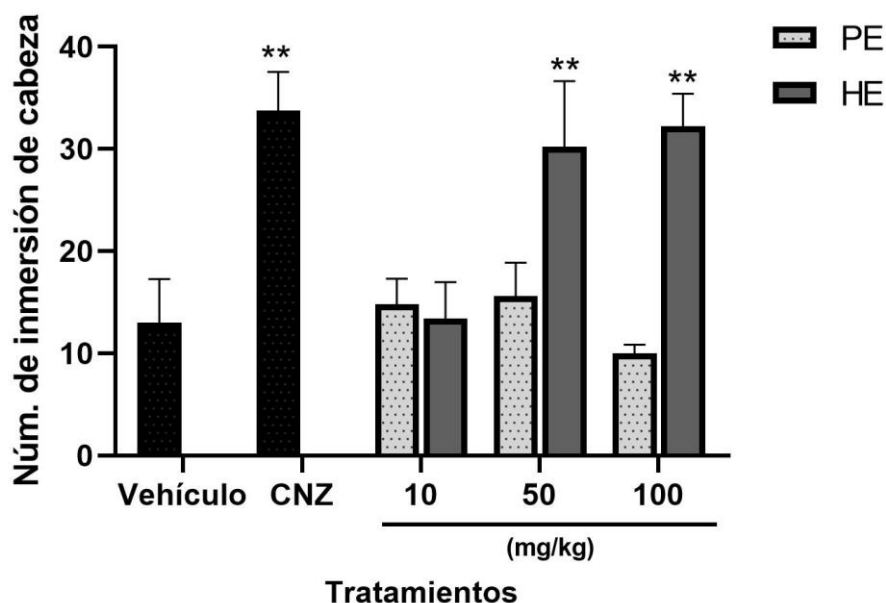


Figura 30. Tablero de hoyos con los tratamientos de *S. tigrina*. Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba Post hoc de Dunnet. PE: Pseudobulbo Etanólico, HE: Etanólico de Hoja, CNZ: Clonazepam y Vehicle: solución salina. ** $p < 0.05$ comparado con el grupo vehículo.

La dosis efectiva 50 (DE_{50}) para el extracto HE fue de 11.52 mg/kg, dosis que produce la respuesta farmacológica deseada en el 50% de la población (Figura 31).

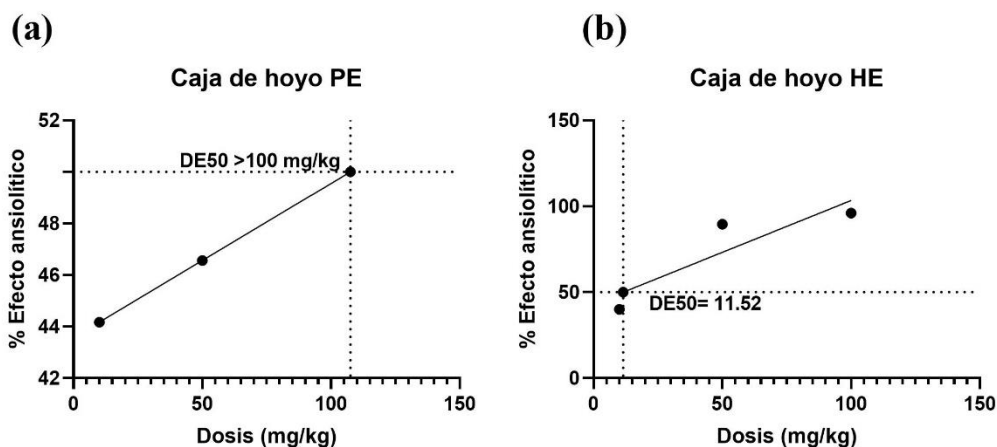


Figura 31. Curvas dosis-respuesta DE_{50} para efecto ansiolítico por el ensayo caja de hoyo.

4.6.3 Mecanismo de acción del modelo de ansiedad

El posible mecanismo de acción de la actividad de tipo ansiolítico se realizó con la prueba del tablero perforado con hoyos a 100 mg/kg HE porque esta dosis mostró una actividad similar a 1.5 mg/kg CNZ. Los pretratamientos con 0.5 mg/kg de prazosina, 1 mg/kg de flumazenil y 1 mg/kg de ketanserina inhibieron ($p < 0.05$) la actividad de tipo ansiolítico presentada por la HE (Figura 32).

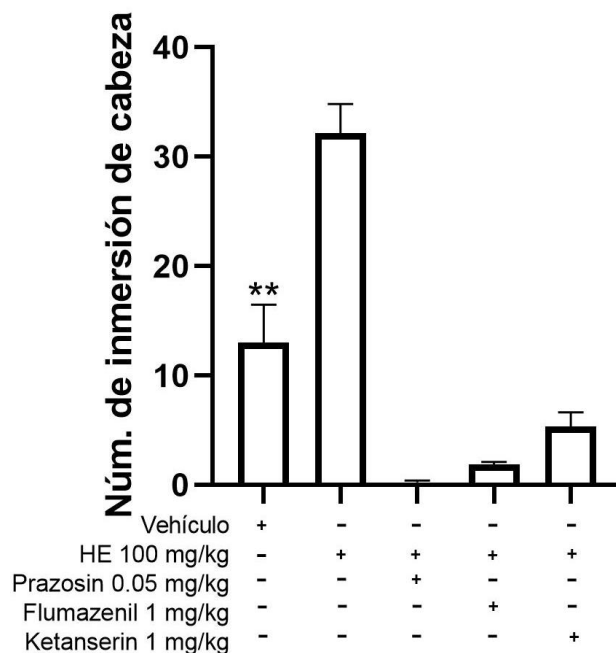


Figura 32. Posible mecanismo de acción del HE en el ensayo del tablero perforado. Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba post hoc de Dunnet. ** $p < 0,05$ respecto al grupo de vehículo.

4.6.4 Prueba de rotarod

Los resultados en la prueba de rotarod indicaron que solo 100 mg/kg de HE a los 60 min después del tratamiento afectaron ($p < 0.05$) la actividad locomotora de los ratones, este efecto no duró hasta los 120 min después del tratamiento (Figura 33b). En el resto de los tratamientos no se observaron diferencias significativas a los 60 y 120 min postratamiento (Figura 33). El CNZ reduce el tiempo que pasaron en la varilla giratoria, indicando un deterioro de la actividad locomotora.

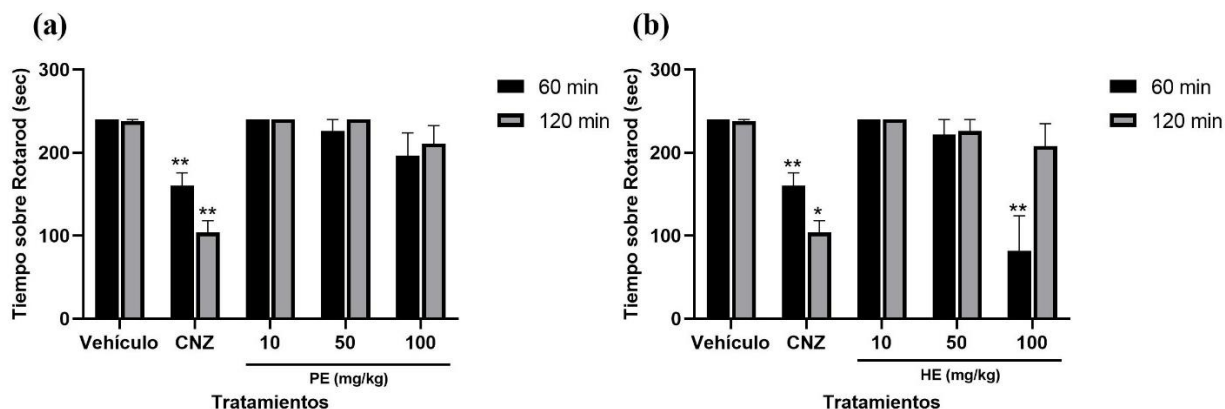


Figura 33. Prueba de rotarod con extracto de *S. tigrina* a los 60 y 120 min. Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba Post hoc de Dunnet. PE: Pseudobulbo Etanólico, HE: Etanólico de Hoja, CNZ: Clonazepam y Vehículo: solución salina. * $p < 0.0001$ comparado con el grupo vehículo.

4.6.5 Prueba de sueño inducida por pentobarbital

Los extractos PE y HE no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el vehículo en la latencia del sueño (Figura 34a) y la duración del sueño (Figura 34b), lo que indica que PE y HE no mostraron actividad sedante ni hipnótica (Figura 34). Se observó un aumento ligero, pero no significativo en la duración del sueño con 100 mg/kg de HE (Fig. 34b). CNZ (1.5 mg/kg) disminuye el tiempo de latencia del sueño y aumenta la duración del sueño, esto indica actividad sedante e hipnótica.

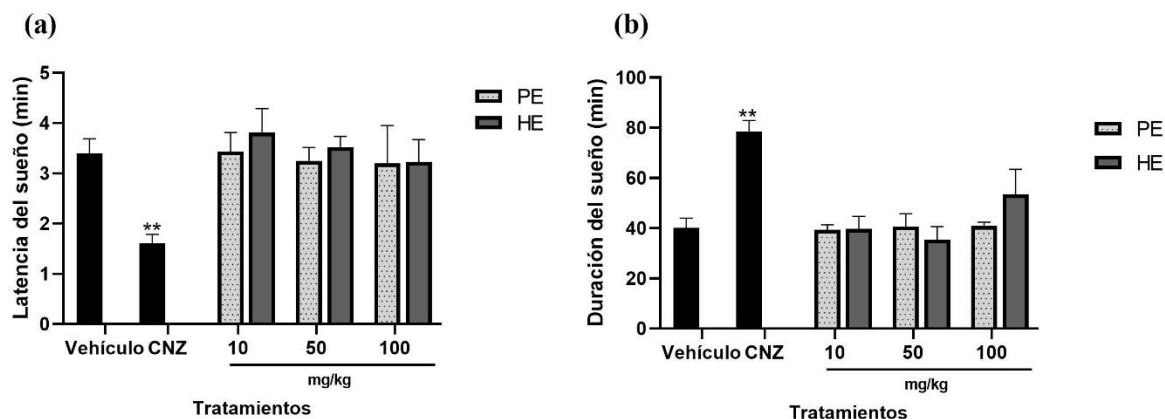


Figura 34. Prueba de sueño inducida por pentobarbital con los extractos de *S. tigrina*. Latencia de sueño (a) y duración de sueño (b). Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba Post hoc de Dunnett. PE: Pseudobulbo Etanólico, HE: Etanólico de Hoja, CNZ: Clonazepam y Vehículo.

4.7 Efecto diurético de los extractos de *S. tigrina*

Se evaluó el efecto diurético de los extractos PE y HE de *S. tigrina*. El tratamiento PE no aumentó la excreción de orina, por lo tanto, no se realizó la medición de pH y de los electrolitos Na^+ y K^+ (no se muestran los resultados). El tratamiento HE a 100 y 50 mg/kg incrementó el volumen de orina excretado, con una diferencia significativa respecto al vehículo ($p < 0.05$) (Figura 35a). Los valores de pH de la orina recolectada con el tratamiento HE no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 35b). En la excreción de Na^+ y K^+ , HE a 100 mg/kg mostró diferencias significativas con el vehículo (Figura 35cd). La eliminación de Na^+ fue similar a furosemida FUR a una dosis de 10 mg/kg (Figura 35c) mientras que la excreción de K^+ fue menor al control (Figura 35d).

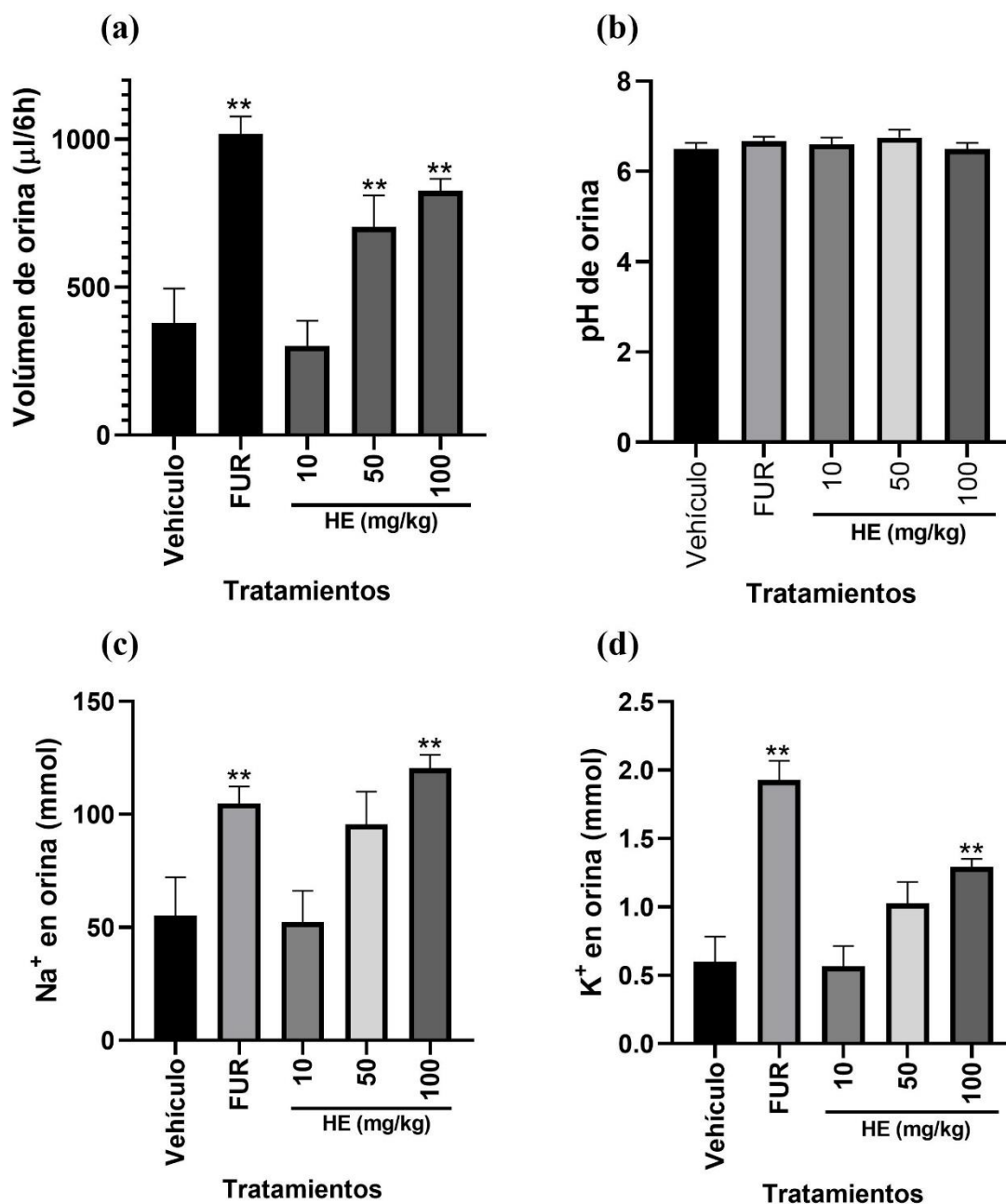


Figura 35. Efecto diurético de los tratamientos del extracto HE de *S. tigrina*. pH en orina Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba post hoc de Tukey. Na^+ en orina y K^+ en orina. Media $\pm$ SEM, ANOVA con prueba Post hoc de Dunnet. ** $p < 0.05$ comparado con el grupo vehículo. PE: Pseudobulbo Etanólico, HE: Etanólico de Hoja, FUR: Furosemida y Vehículo: solución salina.

La dosis efectiva 50 (DE₅₀) para el efecto diurético del extracto HE fue de 39.47 mg/kg, dosis que produce la respuesta farmacológica deseada en el 50% de la población (Figura 36).

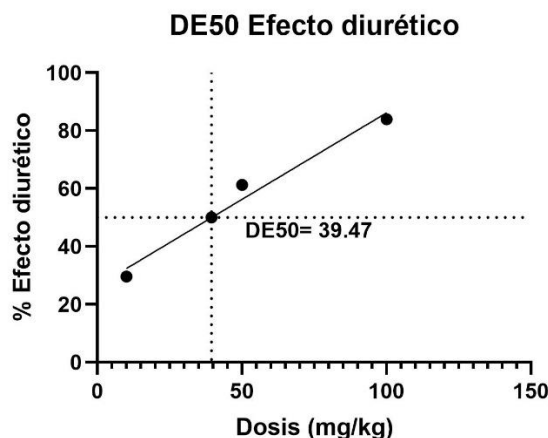


Figura 36. Curvas dosis-respuesta DE₅₀ para efecto diurético.

4.7.1 Mecanismo de acción del modelo de ansiedad

El posible mecanismo de acción de la actividad diurética del extracto HE se evaluó con dos fármacos antagonistas: L-NAME a 60 mg/kg e Indometacina a 5 mg/kg. El pretratamiento con Indometacina no mostró diferencias significativas con HE, mientras que L-NAME inhibió ($p < 0.05$) el efecto diurético mostrado por HE (Fig. 37).

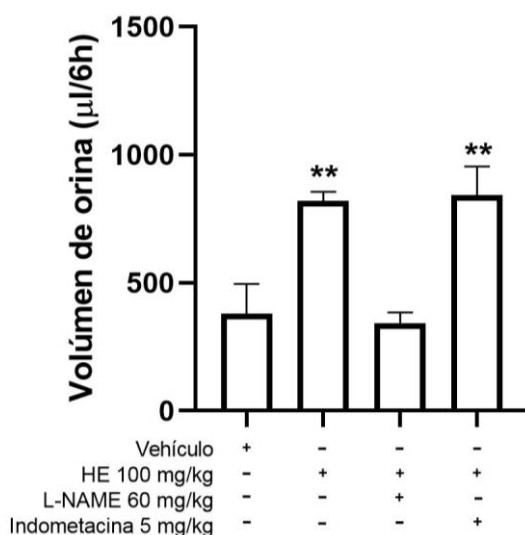


Figura 37. Posible mecanismo de acción del efecto diurético de HE

Media $\pm$ EEM, ANOVA con prueba post hoc de Dunnet. HE: extracto de hoja. ** $p < 0.05$ comparado con el grupo de vehículo.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El uso de *S. tigrina* obtenido mediante el estudio etnobotánico revela su potencial farmacológico. Esta especie es utilizada en la Huasteca Potosina principalmente como tranquilizante ante síntomas asociados a crisis nerviosas o ansiedad. El índice UST = 32%, revela que el uso que se le da a *S. tigrina* tiene aceptación cultural. De acuerdo con Jiménez-Romero *et al.* (2019) un UST superior o igual al 20% es un valor significativo de aceptación cultural y la especie puede considerarse para su validación científica. Por lo tanto, el actual uso medicinal que se le otorga a esta especie impulsó su investigación etnofarmacológica para validar su uso medicinal en la Huasteca Potosina.

En los ensayos para conocer la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH), el contenido fenólico total y flavonoides se encontró una mejor respuesta en el extracto etanólico de hoja (HE), seguido del etanólico de pseudobulbo (PE), ambos extractos realizados mediante extracción por microondas; en comparación con las extracciones acuosas por decocción de hoja (HA) y pseudobulbo (PA), los cuales presentaron respuestas más bajas en los diferentes ensayos. La extracción asistida por microondas (MAE) es de gran interés en la investigación de compuestos bioactivos de tejidos vegetales debido a que acelera la transición de los metabolitos secundarios al solvente (Addo *et al.*, 2022; Barroso *et al.*, 2023; Cañadas *et al.*, 2023; Thi & Tai, 2023; W. Wang *et al.*, 2023). Las microondas se absorben y se convierten en energía térmica calentando desde el interior de la célula vegetal y generando una alta presión sobre la pared celular ocasionando su ruptura, esto permite que los compuestos bioactivos se filtren hacia el solvente mejorando el rendimiento de extracción (Mandal *et al.*, 2015).

El solvente utilizado es un factor importante en la MAE, cuando las microondas entran en contacto con el solvente polar se genera un calentamiento dieléctrico en las moléculas a través de la conducción iónica y la rotación dipolar, provocando un aumento de iones disueltos entrando al interior de la célula para la captación de los metabolitos secundarios (Liu *et al.*, 2019). La MAE mediante el sistema de recipiente cerrado es otro factor a considerar, debido a que la temperatura puede alcanzar valores más altos que el punto

de ebullición, ocasionando una rápida ruptura de la pared celular y preservado a su vez las cualidades funcionales de los compuestos bioactivos (Harith *et al.*, 2023).

Los compuestos bioactivos extraídos de orquídeas medicinales tienen un rol importante en el área farmacéutica (Gantait *et al.*, 2021). Los metabolitos secundarios más comunes en las plantas son los polifenoles y la mayoría presentan una alta actividad antioxidante (Devkota & Adhikari-Devkota, 2022), los flavonoides son compuestos polifenólicos, y debido a su estructura también poseen una alta capacidad antioxidante, actividad biológica que se ha relacionado con algunos efectos farmacológicos, como: antilipoperoxidantes, antivirales, radioprotectores, antimutagénicos, diuréticos, neuroprotectores y antiinflamatorios (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019). Algunos flavonoides presentan efectos farmacológicos a nivel periférico y del SNC, pueden interactuar con varios sistemas de neurotransmisión que incluyen la modulación del complejo GABAA/receptor de benzodiacepinas, cambios en los niveles de serotonina y restauración de los niveles de dopamina y noradrenalina, vías de señalización relacionadas con la ansiedad (Rodríguez-Landa *et al.*, 2022).

En algunas especies de la familia *Orchidaceae*, como en: *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, *Dendrobium amoenum* Wall. ex Lindl, *Dendrobium chryseum* Rolfe, *Dendrobium candidum* ex Lindl, *Pholidota chinensis* Lindl (Nugraha 2020) y en *Rhynchostele rossii* (Lindl.) se ha confirmado la actividad antioxidante (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2020).

La ansiedad se ha relacionado con el desequilibrio de las enzimas antioxidantes del SNC, estas aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando estrés oxidativo, el cual genera daño en las membranas neuronales (Rodríguez-Landa *et al.*, 2022).

Algunos estudios clínicos y preclínicos han informado sobre la disminución del estrés oxidativo a nivel periférico asociado a síntomas de ansiedad (Bouayed *et al.*, 2007; Salim *et al.*, 2010; Ghaemi, Kerafirodi & Michal, 2020). El estrés es el precursor del desarrollo de los trastornos de ansiedad en humanos y animales, debido a que activa el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA) liberando el factor liberador de corticotropina (CRF) que induce la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Ante la presencia de ACTH se libera el cortisol en humanos y la corticosterona en roedores, conocidas como hormonas del

estrés y precursoras de las enfermedades neuropsiquiátricas, como la ansiedad (Farzamfard *et al.*, 2022).

Para la validación farmacológica del uso medicinal de *S. tigrina* los estudios se realizaron con los extractos HE y PE obtenidos mediante MAE. La actividad ansiolítica se evaluó con la prueba de cilindro exploratorio y la prueba de tablero perforado, ensayos asociados a respuestas neuroconductuales (Asif *et al.*, 2021). Estas pruebas son aceptadas para estudiar el comportamiento caracterizado por la exploración (deambulación y levantamientos), considerando que en un ambiente desconocido se modifican factores psicológicos como la ansiedad, miedo y curiosidad (Nakama *et al.*, 1972).

En la prueba de cilindro exploratorio la reducción de levantamientos exploratorios después de la administración del tratamiento indica un efecto ansiolítico (González-Trujano *et al.*, 2006). Las dosis administradas de HE y PE no mostraron similitud respecto al CNZ 1.5 mg/kg; sin embargo, se registró un menor número de levantamientos conforme aumentó la dosis, estas observaciones sugieren que *S. tigrina* tiene un efecto tipo ansiolítico dependiente de la dosis.

La prueba de tablero perforado con hoyos evalúa los trastornos de ansiedad generalizada, ansiedad social y pánico mediante el comportamiento exploratorio de los ratones, debido a que cuando son expuestos a un entorno desconocido este les genera estrés y presentan cambios conductuales (Himanshu *et al.*, 2020). Cuando el tratamiento ocasiona disminución del número de inmersiones de cabeza en la prueba de tablero perforado, confirma actividad antipsicótica, mientras que el aumento de exploraciones en los agujeros se traduce como actividad de tipo ansiolítica (Ahmadu *et al.*, 2022). En la prueba de tablero perforado HE mostró actividad de tipo ansiolítico, en las dosis de 50 y 100 mg/kg, se observó un aumento en el número de exploraciones actividad similar al CNZ, lo cual sugiere un menor estado de ansiedad. Los hallazgos muestran que el extracto HE de *S. tigrina* induce un efecto ansiolítico dependiente de la dosis.

El CNZ pertenece a la familia de los benzodiacepinas, potencian la acción del GABA produciendo efectos inhibidores sobre el SNC, además de la actividad ansiolítica se pueden presentar algunos efectos adversos como los: sedantes, hipnóticos y reductores de la actividad locomotora (Angel J Alonso-Castro *et al.*, 2020).

En el rotarod se evaluó el efecto de los extractos HE y PE de *S. tigrina* sobre la actividad locomotora. La actividad observada fue similar a la del vehículo, con diferencias significativas con el CNZ ($p < 0.05$), sin embargo, a la dosis de 100 mg/kg HE mostró un menor tiempo de permanencia en el rotarod respecto al CNZ 1.5 mg/kg con la consecuente pérdida de las características evaluadas, lo que sugiere que a mayor dosis se tiene un efecto depresor sobre el Sistema Nervioso Central (CNS).

El efecto hipnótico y sedante de HE y PE se observó mediante la prueba de sueño inducida por pentobarbital. Es una prueba en la que el pentobarbital induce el efecto hipnótico y sedante (Alonso-Castro *et al.*, 2020), debido a que se une a los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) subtipo A (Bustos-Gómez *et al.*, 2022). Los resultados sugieren que los tratamientos PE y HE de *S. tigrina* no potencian el efecto hipnótico y sedante del pentobarbital. Sin embargo, la dosis de 100 mg/kg del HE de *S. tigrina* presentó un ligero aumento en el tiempo de duración del sueño, aunque menor que el efecto del control positivo.

Los ensayos neurofarmacológicos de antagonismo sugieren que los posibles mecanismos de acción de la actividad ansiolítica de HE se relacionen de forma directa o indirecta mediante los sistemas gabaérgico, adrenérgico y serotoninérgico. La actividad ansiolítica del extracto HE de *S. tigrina* se vio inhibida por los fármacos antagonistas flumazenil, prazosina y ketanserina, los cuales se unen a los receptores GABA (Felice *et al.*, 2022), α_1 -AR (Kawanabe *et al.*, 2023) y 5-HT₂ (Martínez-Hernández *et al.*, 2021) respectivamente.

El principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), reduce la actividad neuronal, regula la función cognitiva, el comportamiento emocional y la respuesta del cuerpo frente al estrés (Ibarra *et al.*, 2010).

Los receptores α_2 -Adrenergic (α_2 -ARs) se expresan en regiones cerebrales noradrenergicas y serotoninergicas, y participan en la modulación de la depresión y la ansiedad (Schramm *et al.*, 2001). Mientras que los receptores de serotonina 5-HT₂, situados en el hipocampo y amígdala, participan en la modulación de funciones cognitivas, emoción humana y en la regulación de la ansiedad (Nunes-de-Souza *et al.*, 2008).

El hecho de que los fármacos antagonistas flumazenil, prazosina y ketanserina participen en la inhibición del efecto ansiolítico de HE de *S. tigrina*, puede deberse a que

diversos compuestos presentes sean los responsables de la actividad ansiolítica, y por lo tanto estén actuando por los tres sistemas, gabaérgico, adrenérgico y serotoninérgico, pero sin producir efectos adversos hipnóticos, de sedación y reducción en la actividad locomotora típicos del CNZ.

Este es el primer estudio farmacológico que evalúa el efecto diurético para validar el uso medicinal de *S. tigrina* en enfermedades asociadas al riñón. Los diuréticos son estimulantes de la excreción de orina, electrolitos y agentes tóxicos, promoviendo efectos renoprotectores (Kurkin *et al.*, 2015). Los resultados evidenciaron que la administración oral del extracto HE de *S. tigrina* a la dosis de 100 mg/kg indujo efecto diurético, actividad similar a furosemida. Los diuréticos de asa bloquean el transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}$ renal en el asa de Henle, estimulando el aumento en la eliminación de orina, disminución del volumen de líquido en los tejidos y aumento de la excreción de electrolitos (Pereira *et al.*, 2023). El aumento del volumen de orina se debe a la inhibición de la reabsorción de iones de sodio y cloruro en el túbulo renal y genera modificaciones en el manejo renal de potasio, calcio, magnesio y ureato (Venkateshwarlu *et al.*, 2015). Una cualidad esencial de un buen diurético es cuando el tratamiento aumenta la excreción de sodio en mayor medida que el potasio (Ntchapda *et al.*, 2016), característica considerada como un buen perfil de seguridad por la reducción de la hipopotasemia, efecto secundario adverso de la furosemida (Hailu & Engidawork, 2014). El incremento en el volumen de orina excretado por efecto de HE aumentó la eliminación urinaria de sodio similar a furosemida, mientras que para potasio a pesar de mostrar un incremento dependiente de la dosis el efecto no fue similar al producido por el control. Los resultados indican que el extracto HE de *S. tigrina* puede actuar como un diurético de asa, aumentando la natriuresis y la kaliuresis, y con poco riesgo de hipopotasemia.

El ensayo para determinar el posible mecanismo de acción se realizó con la administración de dos fármacos antagonistas: L-nitro arginina metil éster (L-NAME) e Indometacina. De acuerdo con los resultados el efecto diurético del extracto HE de *S. tigrina* se vio inhibido con la administración de L-NAME, un inhibidor no selectivo de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Oyagbemi *et al.*, 2022). La inhibición de la NOS por L-NAME ocasiona una progresiva lesión renal con infiltración de macrófagos intersticiales e hipertensión sistémica ocasionada por la reducción del vasodilatador óxido nítrico (NO) a

nivel vascular (Ikeda *et al.*, 2009). Por lo tanto, es probable que el mecanismo de acción del efecto diurético de *S. tigrina* se asocie con la síntesis del óxido nítrico (NO) con un efecto vasodilatador.

Los resultados de este trabajo validan el potencial terapéutico de las hojas de *S. tigrina* como agente ansiolítico y diurético utilizado en la Huasteca Potosina (región central de México).

El presente trabajo de investigación se enfrentó a diversos desafíos o limitantes significativas relacionadas con el CTV. Una de las principales limitantes encontradas fue la poca disponibilidad y difícil obtención de capsulas de semillas viables para su germinación *in vitro*, así como problemas de contaminación y la implementación efectiva de estrictos protocolos de asepsia. A pesar de los esfuerzos dedicados a optimizar los protocolos de cultivo, la tasa de germinación alcanzada fue inferior a la esperada, por lo que se optó por realizar resiembras de vitroplantas de *S. tigrina* para la obtención del material vegetal. Estos obstáculos contribuyeron con la generación de conocimiento en el campo de CTV.

Otra de las limitantes encontradas en el CTV fue la baja actividad biológica que presentó el extracto (IE) de *S. tigrina in vitro*, en el tamizaje fitoquímico, actividad antioxidante (ABTS y DPPH), el CFT y contenido de flavonoides comparado con los extractos (PE y HE) del material vegetal silvestre. Debido a esto el extracto IE no se probó en las pruebas farmacológicas realizadas en esta investigación.

VI. CONCLUSIONES

La primera etapa de este estudio, destinada a establecer el cultivo *in vitro* de *S. tigrina*, se vio obstaculizada por la escasa disponibilidad de capsulas de semillas y por problemas de contaminación. Sin embargo, fue posible la obtención de plántulas de 7.4 ± 0.92 cm para realizar los estudios etnofarmacológicos.

Este estudio describe, por primera vez, información etnomedicinal sobre la orquídea *S. tigrina*. Los hallazgos validan el uso medicinal de *S. tigrina* como fuente de compuestos con efectos ansiolíticos y diuréticos. Las pruebas farmacológicas confirman que la administración del extracto HE ejerce actividad similar a la de un ansiolítico sin producir deterioro hipnótico, sedante ni locomotor, que son efectos adversos mostrados por CNZ. Los posibles mecanismos de los efectos ansiolíticos del extracto HE se deben a la participación de los sistemas gabaérgico, adrenérgico y serotoninérgico. sugiriendo que la actividad ansiolítica de *S. tigrina* se debe a diversos compuestos bioactivos presentes en el extracto.

El extracto HE de *S. tigrina* también mostró efecto diurético con un aumentó en la excreción de sodio y en menor medida de potasio, característica de un buen diurético al reducir el riesgo del efecto adverso de hipopotasemia. El posible mecanismo de acción es a través de la síntesis del óxido nítrico (NO), inhibiendo los transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, con el consecuente aumento en la excreción de los electrolitos.

Los resultados de esta investigación proporcionan una base sólida para futuros estudios sobre *Stanhopea tigrina*, ofreciendo información relevante para la medicina tradicional, la investigación farmacéutica y el desarrollo de nuevas terapias naturales.

VII. PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

Las perspectivas de esta investigación son prometedoras y comprenden diversas áreas de estudio y aplicación entre las que destacan las siguientes:

Dado que *S. tigrina* es una especie endémica y sujeta a la pérdida de hábitat y la sobreexplotación, es importante implementar medidas de conservación para proteger sus poblaciones silvestres. Esto puede incluir programas de reforestación, monitoreo de poblaciones y educación sobre la importancia de la conservación de orquídeas nativas.

Además, la dificultad para establecer el cultivo *in vitro* de orquídeas silvestres debido a la poca disponibilidad y difícil obtención de capsulas de semillas viables para su germinación *in vitro*, así como los problemas de contaminación destaca los desafíos asociados con esta técnica, subrayando la necesidad de ajustar y optimizar los protocolos de cultivo para futuras investigaciones. Esto permitirá obtener vitroplantas viables para investigaciones futuras y facilitará la producción a gran escala de material vegetal con fines medicinales.

Por otra parte, es necesario realizar estudios específicos para identificar los compuestos que estén actuando en cada uno de los sistemas y vías de señalización, responsables tanto de la actividad ansiolítica como del efecto diurético. Esto proporcionará una comprensión más profunda de los mecanismos de acción subyacentes y permitirá el desarrollo de terapias más específicas y efectivas. Además de la validación científica de las propiedades medicinales, los compuestos bioactivos de *S. tigrina* pueden tener aplicaciones en la industria farmacéutica.

Los resultados de esta investigación sientan las bases para futuros estudios que contribuirán al conocimiento científico sobre *S. tigrina* y su potencial en diversos campos, desde la medicina hasta la conservación de la biodiversidad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addo, P. W., Sagili, S. U. K. R., Bilodeau, S. E., Gladu-Gallant, F.-A., MacKenzie, D. A., Bates, J., McRae, G., MacPherson, S., Paris, M., Raghavan, V., Orsat, V., & Lefsrud, M. (2022). Microwave- and Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids and Terpenes from Cannabis Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 27(24), 8803. <http://10.0.13.62/molecules27248803>
- Agriculture, S., Campus, S., & Batang, S. (2023). *In vitro* regeneration of Borneo endemic orchid *Vanda hastifera* Rchb . f through protocorm like- bodies. 10(4), 175–180.
- Ahmadu, P. U., Victor, E., & Ameh, F. S. (2022). Studies on some neuropharmacological properties of Nevirapine in mice. *IBRO Neuroscience Reports*, 12, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.11.002>
- Alcántara-Hernández, R., & Hernández-Méndez, A. (2018). Complejos moleculares de la señalización adrenérgica Gaceta Médica de México. *Gaceta Médica de México*, 154, 223–235. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2018/gm182n.pdf>
- Alemu, M., Lulekal, E., Asfaw, Z., Warkineh, B., Debella, A., Abebe, A., Degu, S., & Debebe, E. (2024). Antibacterial activity and phytochemical screening of traditional medicinal plants most preferred for treating infectious diseases in Habru District, North Wollo Zone, Amhara Region, Ethiopia. *PloS One*, 19(3), e0300060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300060>
- Alexander, A., Gansau, J. A., & David, D. (2021). *In vitro* Seed Germination of *Coelogyne asperata* Lindl. (Orchidaceae). *Transactions on Science and Technology*, 8(1), 1–6. <http://tost.unise.org/>
- Alonso-Castro, A. J., Gasca-Martínez, D., Cortez-Mendoza, L. V., Alba-Betancourt, C., Ruiz-Padilla, A. J., & Zapata-Morales, J. R. (2020). Evaluation of the neuropharmacological effects of Gardenin A in mice. *Drug Development Research*, 81(5), 600–608. <https://doi.org/10.1002/ddr.21659>
- Also Fontanet, A., Echiburu Salinas, N., & Pinto Asenjo, J. (2024). Tratamiento farmacológico de los trastornos de ansiedad. *Atención Primaria Práctica*, 6(1), 100189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.appr.2023.100189>

- Amaringo Villa, F., & Hormaza, A. (2011). *Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en thevetia peruviana*.
- Arcidiacono, M., Catalano, C., Motisi, A., Sajeva, M., Carimi, F., & Carra, A. (2021). Influence of Culture Conditions on *In vitro* Asymbiotic Germination of *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana* (Orchidaceae). In *Plants* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/plants10112543>
- Arunachalam, R., Rao Konda, V. G., Eerike, M., Radhakrishnan, A. K., & Devi, S. (2021). Nephroprotective effects of ethanolic root extract of *Azima tetraantha* lam in adenine-induced chronic kidney failure in Wistar rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 53(3), 198–206. https://doi.org/10.4103/ijp.IJP_552_19
- Ashraf, S., Sayeed, S. A., Ali, R., Vohra, F., Ahmed, N., & Alam, M. K. (2022). Assessment of Potential Benefits of Functional Food Characteristics of Beetroot Energy Drink and Flavored Milk. *BioMed Research International*, 2022, 1971018. <https://doi.org/10.1155/2022/1971018>
- Asif, M., Dwivedi, J., & Yadav, S. (2021). Anti-depressant, Anxiolytic, and the Muscle Relaxant Activity of Hydroalcoholic Extract of *Cissampelos pareira* Linn. Leaves. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 21(2), 114–124. <https://doi.org/10.2174/1871524921666210505101704>
- Baretta, I. P., Felizardo, R. A., Bimbato, V. F., dos Santos, M. G. J., Kassuya, C. A. L., Gasparotto Junior, A., da Silva, C. R., de Oliveira, S. M., Ferreira, J., & Andreatini, R. (2012). Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.047>
- Barroso, T. L. C. T., Castro, L. E. N., F. Barbero, G., Palma, M., Carrera, C., Rostagno, M. A., & Forster-Carneiro, T. (2023). Optimization of a Microwave-Assisted Extraction Method for the Recovery of the Anthocyanins from Jabuticaba By-Products. *Agronomy*, 13(2), 556. <http://10.0.13.62/agronomy13020556>
- Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., & Soulimani, R. (2007). Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *European Journal of Pharmacology*, 564(1), 146–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.055>

- Boulogne, I., Germosén-Robineau, L., Ozier-Lafontaine, H., Fleury, M., & Loranger-Merciris, G. (2011). TRAMIL ethnopharmacological survey in Les Saintes (Guadeloupe, French West Indies): a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 1039–1050. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.034>
- Bourin, M. (2021). *Mechanisms of Action of Anxiolytics BT - Psychiatry and Neuroscience Update: From Epistemology to Clinical Psychiatry – Vol. IV* (P. Á. Gargiulo & H. L. Mesones Arroyo (eds.); pp. 195–211). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61721-9_18
- Bustos-Gómez, C. I., Gasca-Martínez, D., Yáñez-Barrientos, E., Hidalgo-Figueroa, S., Gonzalez-Rivera, M. L., Barragan-Galvez, J. C., Zapata-Morales, J. R., Isiordia-Espinoza, M., Corrales-Escobosa, A. R., & Alonso-Castro, A. J. (2022). Neuropharmacological Activities of *Ceiba aesculifolia* (Kunth) Britten & Baker f (Malvaceae). In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ph15121580>
- Cañadas, R., Sáenz de Miera, B., Méndez, P., González, E. J., & González-Miquel, M. (2023). Enhanced Recovery of Natural Antioxidants from Grape Waste Using Natural Eutectic Solvents-Based Microwave-Assisted Extraction. *Molecules*, 28(3), 1153. <http://10.0.13.62/molecules28031153>
- Cardoner Álvarez, N., & Segalàs Cosí, J. (2003). Fármacos ansiolíticos. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 8(104), 5612–5619. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(03\)71036-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-5412(03)71036-1)
- Carmichael, O., & Lockhart, S. (2012). Neurotrophins and. *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience*, November 2011, 289–320. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Chanh, T. T., Huy, N. T., Ha, N. T., Le, K., & Hoang, N. H. (2023). Effects of plant preservative mixture™ on *in vitro* germination of <i>Dendrobium thyrsiflorum</i> Rchb.f. and its application in orchid conservation. *Journal of Plant Biotechnology*, 50(1), 108–114. <https://doi.org/10.5010/JPB.2023.50.014.108>
- Cianconi, P., Lesmana, C. B. J., Ventriglio, A., & Janiri, L. (2019). Mental health issues among indigenous communities and the role of traditional medicine. *The International Journal of Social Psychiatry*, 65(4), 289–299. <https://doi.org/10.1177/0020764019840060>

- Costa, C. A. R. de A., Kohn, D. O., de Lima, V. M., Gargano, A. C., Flório, J. C., & Costa, M. (2011). The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 828–836. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.003>
- Devi M S, S. (2011). Acute toxicity and diuretic activity of mangifera indica L. bark extracts. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 141–146.
- Devkota, H. P., & Adhikari-Devkota, A. (2022). Chapter 4.12 - Phenolic acids (S. M. Nabavi & A. S. B. T.-A. E. in H. Silva (eds.); pp. 427–436). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00014-8>
- Diao, Z., Yu, H., Wu, Y., Sun, Y., Tang, H., Wang, M., Li, N., Ge, H., Sun, J., & Gu, H. F. (2023). Identification of the main flavonoids of *Abelmoschus manihot* (L.) Medik and their metabolites in the treatment of diabetic nephropathy. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1290868. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1290868>
- Dodson, C. H. 1975. Clarification of some nomenclature in the genus *Stanhopea* (Orchidaceae). *Selbyana* 1:46-55.
- Dodson, J. L., Jerry-Fluker, J. V, Ng, D. K., Moxey-Mims, M., Schwartz, G. J., Dharnidharka, V. R., Warady, B. A., & Furth, S. L. (2011). Urological Disorders in Chronic Kidney Disease in Children Cohort: Clinical Characteristics and Estimation of Glomerular Filtration Rate. *The Journal of Urology*, 186(4), 1460–1466. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.05.059>
- Domínguez Domínguez, J. A., Expósito Duque, V., & Torres Tejera, E. (2024). Epidemiología de la ansiedad y su contexto en atención primaria. *Atención Primaria Práctica*, 6(2), 100194. <https://doi.org/10.1016/j.appr.2024.100194>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: Medias for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Rocha, L., Heinze, G., González Esquinca, A. R., & Martínez-Vázquez, M. (2010). Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Pharmaceutical Biology*, 48(1), 70–75. <https://doi.org/10.3109/13880200903046153>
- Expósito-Duque, V., Torres-Tejera, M. E., & Domínguez Domínguez, J. A. (2024).

- Determinantes sociales de la ansiedad en el siglo XXI. *Atención Primaria Práctica*, 6(2), 100192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.appr.2024.100192>
- Fajemiroye, J. O., da Silva, D. M., de Oliveira, D. R., & Costa, E. A. (2016). Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 30(3), 198–215. <https://doi.org/10.1111/fcp.12186>
- Fan, H.-Y., Wang, X.-K., Li, X., Ji, K., Du, S.-H., Liu, Y., Kong, L.-L., Xu, J.-C., Yang, G.-Q., Chen, D.-Q., & Qi, D. (2020). Curcumin, as a pleiotropic agent, improves doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 250, 112502. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112502>
- Farzamfard, P., Rezayof, A., & Alijanpour, S. (2022). Ventral hippocampal NMDA receptors mediate the effects of nicotine on stress-induced anxiety/exploratory behaviors in rats. *Neuroscience Letters*, 780, 136649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136649>
- Fathi, R., Akbari, A., Nasiri, K., & Chardahcherik, M. (2021). Ginger (*Zingiber officinale* roscoe) extract could upregulate the renal expression of NRF2 and TNF α and prevents ethanol-induced toxicity in rat kidney. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 11(2), 134–145.
- Felice, D., Cryan, J. F., & O’Leary, O. F. (2022). GABA(B) Receptors: Anxiety and Mood Disorders. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 52, 241–265. https://doi.org/10.1007/7854_2020_171
- Fritsche, Y., Deola, F., da Silva, D. A., Holderbaum, D. F., & Guerra, M. P. (2022). *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) *in vitro* regeneration: Main factors for optimal protocorm-like body induction and multiplication, plantlet regeneration, and cytogenetic stability. *South African Journal of Botany*, 149, 96–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.059>
- Gantait, S., Das, A., Mitra, M., & Chen, J.-T. (2021). Secondary metabolites in orchids: Biosynthesis, medicinal uses, and biotechnology. *South African Journal of Botany*, 139, 338–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.015>
- Ghaemi Kerafirodi, J., & Michal, M. (2020). The fear-defense system, emotions, and oxidative stress. *Redox Biology*, 37, 101588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101588>

- Gołyszny, M. J., & Obuchowicz, E. (2018). Medicinal Plant Materials in the Treatment of Anxiety Disorders: Neurobiological Aspects. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 24(5), 44–57.
- González-Trujano, M. E., Martínez, A. L., Reyes-Ramírez, A., Reyes-Trejo, B., & Navarrete, A. (2006). Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica*, 72(8), 703–707. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931598>
- Grundmann, O., Wang, J., McGregor, G. P., & Butterweck, V. (2008). Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Medica*, 74(15), 1769–1773. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088322>
- Gutiérrez-Sánchez, A., Monribot-Villanueva, J. L., Cocotle-Ronzón, Y., Martínez-Cruz, N. S., & Guerrero-Analco, J. A. (2020). Phenolic profile and antioxidant activity from wild and *in vitro* cultivated *Rhynchosystele rossii* (Orchidaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 2020(127), 1–11. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1665>
- Guzmán, S. L., Reyes, R., & Bonilla, H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 591–608.
- Hailu, W., & Engidawork, E. (2014). Evaluation of the diuretic activity of the aqueous and 80% methanol extracts of *Ajuga remota* Benth (Lamiaceae) leaves in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 135. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-135>
- Harith, N. S., Rahman, N. A., Zamanhuri, N. A., & Hashib, S. A. (2023). Microwave-based antioxidant extraction from pineapple peel waste. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.02.384>
- Harzli, I., & Kömpe, Y. Ö. (2023). Assessing the effectiveness of *in vitro* and *in situ* symbiotic seed germination: case of *Anacamptis papilionacea* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W. Chase. *Symbiosis*, 91(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s13199-023-00950-8>
- Hattesoehl, M., Feistel, B., Sievers, H., Lehnfeld, R., Hegger, M., & Winterhoff, H. (2008). Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine : International Journal of*

- Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(1–2), 2–15.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.11.027>
- Heritch, A. J., Henderson, K., & Westfall, T. C. (1990). Effects of social isolation on brain catecholamines and forced swimming in rats: Prevention by antidepressant treatment. *Journal of Psychiatric Research*, 24(3), 251–258.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-3956\(90\)90014-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-3956(90)90014-H)
- Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019). *Chapter 14 - Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity* (M. R. S. B. T.-B. C. Campos (ed.); pp. 265–288). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1>
- Hernández Ramírez, F., Iracheta Donjuan, L., Damon, A., Fernández Pavía, S. P., & Guillén Navarro, K. (2023). Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae). *Polibotánica*, 0(56), 151–170.
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.8>
- Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, J. E., De Lima, T. C. M., Avilés-Montes, D., Pérez-García, D., González-Cortazar, M., & Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 13(1–2), 23–28.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.03.003>
- Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Reyes-Chilpa, R., León, E., García, M. P., Tortoriello, J., & Huerta-Reyes, M. (2011). Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 18(14), 1255–1261.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.018>
- Herrera-Ruiz, Maribel, García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G. S. B., Tortoriello, J., & Ramírez, G. (2006). Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.003>
- Herrera-Ruiz, Maribel, González-Carranza, A., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Huerta-

- Reyes, M., & Navarro-García, V. M. (2011). The standardized extract of *Loeselia mexicana* possesses anxiolytic activity through the γ -amino butyric acid mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.010>
- Herrera-Ruiz, Maribel, Román-Ramos, R., Zamilpa, A., Tortoriello, J., & Jiménez-Ferrer, J. E. (2008). Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.019>
- Himanshu, Dharmila, Sarkar, D., & Nutan. (2020). A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 18(3), 341–351. <https://doi.org/10.9758/CPN.2020.18.3.341>
- Ibarra, A., Feuillere, N., Roller, M., Lesburgere, E., & Beracochea, D. (2010). Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine*, 17(6), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.01.012>
- Ikeda, H., Tsuruya, K., Toyonaga, J., Masutani, K., Hayashida, H., Hirakata, H., & Iida, M. (2009). Spironolactone suppresses inflammation and prevents L-NAME-induced renal injury in rats. *Kidney International*, 75(2), 147–155. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.507>
- Jiménez-Romero, E., Moreno-Vera, A., Villacis-Calderon, A., Rosado-Sabando, J., Morales-Moreira, D., & Bravo-Bravo, A. (2019). Estudio etnobotánico y comercialización de plantas medicinales del bosque protector Murocomba y su área de influencia del cantón Valencia, Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20. https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num3_art:1597
- Kaladharan, S., Rengasamy, A., Chinnaiyan, R., Mariappan, M., & Thiruppathi, S. K. (2024). *In vitro* asymbiotic seed germination and micropropagation of *Dendrobium heyneanum* Lindl. – an endemic orchid of Western Ghats, India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 157(2), 31. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02758-w>
- Kärkönen, A., Santanen, A., Iwamoto, K., & Fukuda, H. (2020). *Plant Tissue Cultures BT - The Plant Cell Wall: Methods and Protocols* (Z. A. Popper (ed.); pp. 89–109). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0621-6_6

- Kawanabe, S., Mori, M., Harada, H., Murata, Y., Ohe, K., & Enjoji, M. (2023). Upregulations of $\alpha(1)$ adrenergic receptors and noradrenaline synthases in the medial prefrontal cortex are associated with emotional and cognitive dysregulation induced by post-weaning social isolation in male rats. *Neuroscience Letters*, 797, 137071. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137071>
- Khan, M. A., Kassianos, A. J., Hoy, W. E., Alam, A. K., Healy, H. G., & Gobe, G. C. (2022). Promoting Plant-Based Therapies for Chronic Kidney Disease. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 27, 2515690X221079688. <https://doi.org/10.1177/2515690X221079688>
- Kurkin, V. A., Zaitseva, E. N., Kurkina, A. V, Dubishchev, A. V, & Pravdivtseva, O. E. (2015). Comparative Study of Diuretic Activity of Hydroalcoholic Extracts from Medicinal Plants Containing Flavonoids. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 159(3), 368–371. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2965-y>
- Leichsenring, F., Heim, N., & Steinert, C. (2023). A Review of Anxiety Disorders. In *JAMA* (Vol. 329, Issue 15, pp. 1315–1316). <https://doi.org/10.1001/jama.2023.2428>
- Lejeune, V. B. P., Lopes, R. V., Baggio, D. F., Koren, L. de O., Zanolli, J. M., & Chichorro, J. G. (2023). Antinociceptive and anxiolytic-like effects of *Lavandula angustifolia* essential oil on rat models of orofacial pain. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 30, e20220304. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2002-0304>
- Liu, Y., Kan, H., Fan, F.-Y., Tang, J.-R., Zhang, Y.-J., & Zhao, P. (2019). Microwave-Assisted Extraction and Antioxidant Activities of Polyphenols from *Camellia Fascicularis* Leaves. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 17(2), 164–171. <https://creativaplus.uaslp.mx/login?user=edsusr&pass=rsusde&acceso=1&url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=asn&AN=136715486&lang=es&site=ehost-live>
- López-Rubalcava, C., & Estrada-Camarena, E. (2016). Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 377–391. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.053>
- Macaya Sandoval, X. C., Pihan Vyhmeister, R., & Vicente Parada, B. (2018). Evolución del constructo de Salud mental desde lo multidisciplinario . In *Humanidades Médicas* (Vol. 18, pp. 338–355). scielocu .

- Manda, G., Rojo, A. I., Martínez-Klimova, E., Pedraza-Chaverri, J., & Cuadrado, A. (2020). Nordihydroguaiaretic Acid: From Herbal Medicine to Clinical Development for Cancer and Chronic Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 151. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00151>
- Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Classification of Extraction Methods. In *Essentials of Botanical Extraction*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802325-9.00006-9>
- Martínez-Hernández, G. B., Jiménez-Ferrer, E., González-Cortazar, M., Román-Ramos, R., Tortoriello, J., Vargas-Villa, G., & Herrera-Ruiz, M. (2021). Antidepressant and anxiolytic compounds isolated from *Salvia elegans* interact with serotonergic drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(12), 2419–2428. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02155-6>
- Moini, J., Ahangari, R., Miller, C., & Samsam, M. (2020). Chapter 11 - Urologic problems (J. Moini, R. Ahangari, C. Miller, & M. B. T.-G. H. C. of O. Samsam (eds.); pp. 257–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819751-6.00011-6>
- Molina-Hernández, M., Tellez-Alcántara, N. P., García, J. P., Lopez, J. I. O., & Jaramillo, M. T. (2004). Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.039>
- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, P., & Martínez, E. (2000). Agastache mexicana may produce anxiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 7(3), 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80004-5)
- Molina, M., Contreras, C. M., Tellez-Alcantara, P., & Rodriguez, F. (1999). Sedative actions of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 6(2), 115–118. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80045-2](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80045-2)
- Moushome, R. A., Akter, M. I., & Aziz, M. A. (2016). Phytochemical Screening and Antinociceptive and Antidiarrheal Activities of Hydromethanol and Petroleum Benzene Extract of *Microcos paniculata* Barks. *BioMed Research International*, 2016, 3167085. <https://doi.org/10.1155/2016/3167085>

- NAKAMA, M., OCHIAI, T., & KOWA, Y. (1972). EFFECTS OF PSYCHOTROPIC DRUGS ON EMOTIONAL BEHAVIOR: EXPLORATORY BEHAVIOR OF NAIVE RATS IN HOLED OPEN FIELD. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 22(6), 767–775. <https://doi.org/10.1254/jjp.22.767>
- Ntchapda, F., Bonabe, C., Kemeta Azambou, D. R., Talla, E., & Dimo, T. (2016). Diuretic and antioxidant activities of the aqueous extract of leaves of *Vepris heterophylla* (Engl.) R. Let (Rutaceae) in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 516. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1439-8>
- Nunes-de-Souza, V., Nunes-de-Souza, R. L., Rodgers, R. J., & Canto-de-Souza, A. (2008). 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavioural Brain Research*, 187(1), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.030>
- Ochoa-de la Paz, L. D., Gullias-Cañizo, R., D'Abril Ruíz-Leyja, E., Sánchez-Castillo, H., & Parodí, J. (2021). The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 22(2), 67–76. <https://doi.org/10.24875/rmn.20000050>
- Oliva, I., González-Trujano, M. E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R., & Navarrete, A. (2004). Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(4), 290–296. <https://doi.org/10.1002/ptr.1389>
- Oyagbemi, A. A., Hassan, F. O., Ajibade, T. O., Ola-Davies, O. E., Omobowale, T. O., Ajani, O. S., Jarikre, T. A., Soetan, K. O., Saba, A. B., Adedapo, A. A., Obemisola Aro, A., Olugbenga Oyeyemi, M., Obukowho Emikpe, B., Nkadimeng, S. M., Joy McGaw, L., Kayoka-Kabongo, P. N., Audu Yakubu, M., & Oguntibeju, O. O. (2022). Antihypertensive action of *Launaea taraxacifolia* and its molecular mechanism of action. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35(6), 1581–1694.
- Panwar, G. S., & Joshi, B. (2024). *In vitro* propagation and clonal fidelity assessment of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume: a threatened ornamental and medicinal orchid. *Vegetos*. <https://doi.org/10.1007/s42535-024-00831-5>
- Pereira, C. R. P., Hardt, M. E., Cechinel-Zanchett, C. C., Mariano, L. N. B., Boeing, T., Cechinel-Filho, V., de Souza, P., & Niero, R. (2023). Diuretic Effect in Rats of Betulinic

- Acid, a Pentacyclic Triterpene from *Citharexylum myrianthum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(1), 208–213. <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00348-5>
- Pytko, K., Podkowa, K., Rapacz, A., Podkowa, A., Zmudzka, E., Olczyk, A., Sapa, J., & Filipiek, B. (2016). The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports*, 68(2), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.08.007>
- Rácz-Kotilla, E., Rácz, G., & Solomon, A. (1974). The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animals. *Planta Medica*, 26(3), 212–217. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1099379>
- Radhika, B., Begum, N., Srisailam, K., & Reddy, V. (2010). Diuretic activity of *Bixa orellana* Linn. Leaf extracts. *Indian J. Nat. Prod. Res.*, 1.
- Raupp, I. M., Sereniki, A., Virtuoso, S., Ghislandi, C., Cavalcanti E Silva, E. L., Trebien, H. A., Miguel, O. G., & Andreatini, R. (2008). Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.016>
- Rejón-Orantes, J. D. C., González-Esquinca, A. R., de la Mora, M. P., Roldan Roldan, G., & Cortes, D. (2011). Annonomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta Medica*, 77(4), 322–327. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250406>
- Rodríguez-Landa, J. F., German-Ponciano, L. J., Puga-Olguín, A., & Olmos-Vázquez, O. J. (2022). Pharmacological, Neurochemical, and Behavioral Mechanisms Underlying the Anxiolytic-and Antidepressant-like Effects of Flavonoid Chrysin. *Molecules*, 27(11). <https://doi.org/10.3390/molecules27113551>
- Salim, S., Sarraj, N., Taneja, M., Saha, K., Tejada-Simon, M. V., & Chugh, G. (2010). Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 545–552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.039>
- Sarmah, D., Mohapatra, P. P., Seleiman, M. F., Mandal, T., Mandal, N., Pramanik, K., Jena, C., Sow, S., Alhammad, B. A., Ali, N., Ranjan, S., & Wasonga, D. O. (2024). Efficient regeneration of *in vitro* derived plants and genetic fidelity assessment of *Phalaenopsis* orchid. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8.

<https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1359486>

- Sarris, J., Panossian, A., Schweitzer, I., Stough, C., & Scholey, A. (2011). Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology*, 21(12), 841–860. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.04.002>
- Sartori, S. B., & Singewald, N. (2019). Novel pharmacological targets in drug development for the treatment of anxiety and anxiety-related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 204, 107402. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107402>
- Schramm, N. L., McDonald, M. P., & Limbird, L. E. (2001). The α 2A-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4875–4882. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-13-04875.2001>
- Sinha, M., Naz, S., Choudhary, R., & Kumari, R. (2023). Extraction of Limonene from Orange Peel and Its Antimicrobial Effect. In *Journal of Research* (Vol. 15, pp. 22–25).
- Soltani, M., Parivar, K., Baharara, J., Kerachian, M. A., & Asili, J. (2014). Hemolytic and cytotoxic properties of saponin purified from *Holothuria leucospilota* sea cucumber. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 3(1), 43–50.
- Srivastav, S., Singh, P., Jha, K. K., Mishra, G., Srivastava, S., Karchuli, M. S., & Khosa, R. L. (2011). Diuretic activity of whole plant extract of *Achyranthes aspera* Linn. *European Journal of Experimental Biology*, 1(2), 97–102. www.pelagiaresearchlibrary.com
- Stanifer, J. W., Kilonzo, K., Wang, D., Su, G., Mao, W., Zhang, L., Zhang, L., Nayak-Rao, S., & Miranda, J. J. (2017). Traditional Medicines and Kidney Disease in Low- and Middle-Income Countries: Opportunities and Challenges. *Seminars in Nephrology*, 37(3), 245–259. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2017.02.005>
- Sui, Y., Liu, W., Tian, W., Li, X.-Q., & Cao, W. (2019). A branched arabinoglucan from *Angelica sinensis* ameliorates diabetic renal damage in rats. *Phytotherapy Research : PTR*, 33(3), 818–831. <https://doi.org/10.1002/ptr.6275>
- Terunuma, M. (2018). Diversity of structure and function of GABA(B) receptors: a complexity of GABA(B)-mediated signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 94(10), 390–411. <https://doi.org/10.2183/pjab.94.026>

- Thi, T. N., & Tai, H. P. (2023). MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION OF CUSTARD APPLE (*ANNONA SQUAMOSAL* L.) PEEL. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 15(1), 220–231. <http://10.0.133.254/crpjfst/2023.15.1.16>
- Tokuhara, K., Sato, H., Abe, A., & Mii, M. (2023). *In vitro* optimization of seed germination and protocorm development in *Gastrochilus japonicus* (Makino) Schltr. (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation*, 101(3), 693–702. <https://doi.org/10.1007/s10725-023-01050-9>
- Trujillo, J., Chirino, Y. I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A. C., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology*, 1(1), 448–456. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.09.003>
- Upadhyay, G., Khoshla, S., Kosuru, R., & Singh, S. (2016). Anxiolytic, antidepressant, and antistress activities of the aqueous extract of *Cinnamomum tamala* Nees and Eberm in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(5), 555–561. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.190752>
- Venkateshwarlu, E., Bhava, B. S. S., Kumar, R. S., Venkateshwar, R. J., Gouthami, E., & Umasankar, K. (2015). Evaluation of diuretic activity of *Syzygium cumini* and its effect on prostaglandin system. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 15(1), 45–51. <https://doi.org/10.1007/s13596-015-0179-5>
- Wang, W., Xiao, S.-Q., Li, L.-Y., & Gai, Q.-Y. (2023). Deep Eutectic Solvent-Based Microwave-Assisted Extraction for the Extraction of Seven Main Flavonoids from *Ribes mandshuricum* (Maxim.) Kom. Leaves. *Separations* (2297-8739), 10(3), 191. <http://10.0.13.62/separations10030191>
- Wang, Z., Yin, G., Liao, X., Zhou, Z., Cao, Y., Li, X., Wu, W., Zhang, S., & Lou, Q. P. (2024). *Cornus officinalis* var. *koreana* Kitam extracts alleviate cadmium-induced renal fibrosis by targeting matrix metalloproteinase 9. *Journal of Ethnopharmacology*, 325, 117824. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.117824>
- Yu, H.-S., Lee, S.-Y., & Jang, C.-G. (2007). Involvement of 5-HT_{1A} and GABA_A receptors in the anxiolytic-like effects of *Cinnamomum cassia* in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 87(1), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.04.013>
- Zhang, Y.-Z., Xu, F., Liang, J., Tang, J.-S., Shang, M.-Y., Wang, X., & Cai, S.-Q. (2012). [Isoflavonoids from roots of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*]. *Zhongguo*

Zhong yao za zhi = *Zhongguo zhongyao zazhi* = *China journal of Chinese materia medica*, 37(21), 3243–3248.

Zhou, L., Han, C., Liu, Y., Cui, T., Shen, Z., Li, X.-Y., Jiang, Y.-H., & Li, W. (2022). Astragalus membranaceus and Salvia miltiorrhiza Ameliorate Hypertensive Renal Damage through lncRNA-mRNA Coexpression Network. *BioMed Research International*, 2022, 3002353. <https://doi.org/10.1155/2022/3002353>

ANEXO I. Estudio etnobotánico para *S. tigrina*

Genero:	Masculino ____	Femenino ____	Edad: ____ años	Ocupación:	Lugar:
---------	----------------	---------------	-----------------	------------	--------

Nombre común de la planta que recomienda	Usted ha usado esta (s) planta (s) medicinal (es)	Enfermedades o fines mágico-religiosos para los que se usa la planta	Parte usada de la planta (raíz, tallo, planta completa, etc.)	Forma de obtención (cultivada o recolectada)	Forma de preparación (infusión, decocción, maceración, etc)	Forma de administración (oral, untada, etc.) y dosis recomendada	¿Ha presentado algún malestar provocado al consumo de esta planta?	Combina esta planta medicinal con medicamento alópata
	Si ____ No ____						Si ____ No ____ ¿Cuál?	Si ____ No ____ ¿Cuál?

ANEXO II. Datos de colecta *in situ*

Especie:	<i>Stanhopea tigrina</i>
Familia:	Orchidaceae
País:	México
Estado:	San Luis Potosí
Municipio:	Aquismón
Ubicación:	Barrio de Jolja, Tampaxal.
Coordenadas:	21°31'44.8"N 99°03'27.8"W
Altura:	819 msnm
Hábitat:	Bosque de niebla, sierra alta de Aquismón, rocas sedimentarias calizas.
Observaciones:	Epífita, posada sobre <i>sambucus</i> o <i>sauco</i> y litófito sobre roca cubierta de musgo.
Colector:	Rocío del Carmen Díaz Torres
Fecha de colecta:	17 de julio del 2021
Número de colecta:	S/N

ANEXO III. Curva de calibración para ABTS

Reactivos:

Sal de diamonio ABTS del ácido 2,2ázinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Roche), persulfato potásico (CTR Scientific), Ácido L(+)-ascórbico (Thermo Scientific Chemicals) y alcohol etílico 96° (Protect).

Material:

Espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Visible, celdillas de acrílico de 10 mm de espesor Hellma®, micropipetas DLAB® 10-100 µL y 100-1000 µL, balanza analítica Citizen® con una precisión de 0.0001 g.

Preparación de los reactivos:

- Solución ABTS 7mM: se pesaron 0.03841g de sal de diamonio ABTS y se disolvieron en 10 mL de agua destilada desionizada.
- Solución de persulfato potásico 2.45 mM: se pesaron 0.06622 g de $K_2S_2O_8$ y se disolvieron en 100 mL de agua destilada desionizada.
- Radical $ABTS^{\bullet+}$: para la formación del cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ verde azulado se hizo reaccionar estequiométricamente 10 mL de la solución ABTS 7 mM y 5 mL de la solución de persulfato potásico 2.45 mM, en una relación 1:0.5, dando como resultado una oxidación incompleta del ABTS. Se dejó reposar la mezcla en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h hasta alcanzar su máxima estabilidad y absorbancia. Posteriormente, el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. El cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ es estable durante 2 días, almacenado en oscuridad. (Re, 1999).

Preparación de la curva de calibración

Se realizó una solución patrón de ácido ascórbico a una concentración de 1.66 mg/mL. Partiendo de esta solución se prepararon diluciones de (20–200 µg/mL). Las diluciones se prepararon por triplicado. Cada punto de la recta de preparó colocando 20 µL de cada dilución y 2 mL de la solución del radical ABTS^{•+} ajustado a una absorbancia de 0.70 ± 0.02 . La mezcla se agitó durante 30 s, se resguardo en oscuridad a temperatura ambiente y a los 20 min se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm (Figura 38).

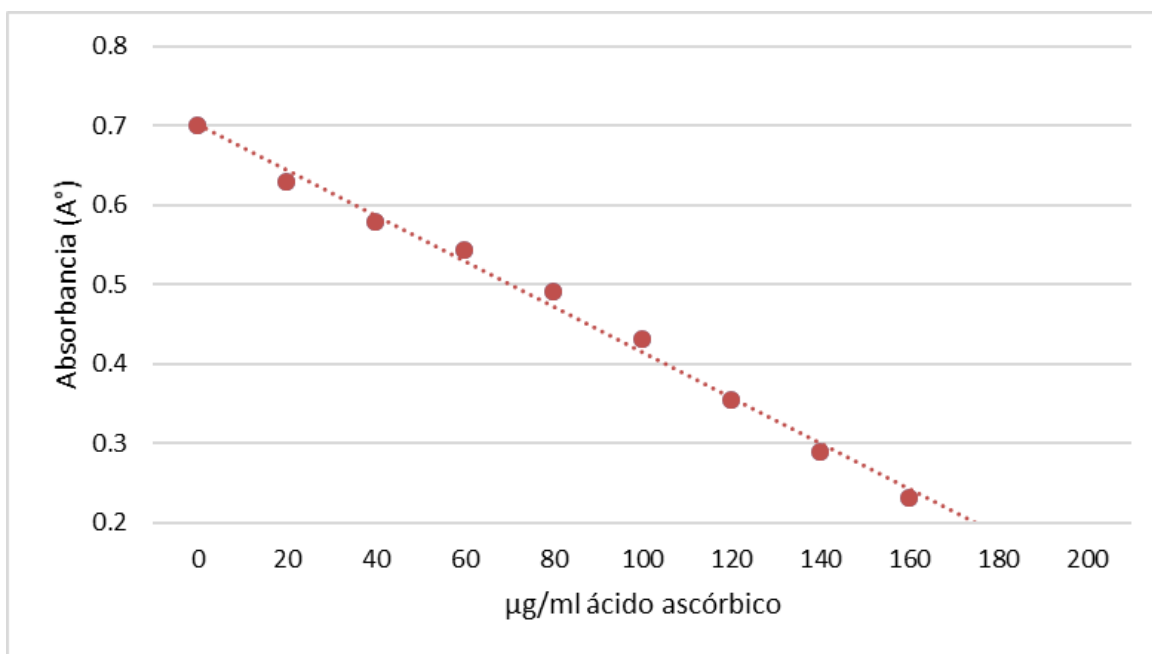


Figura 38. Curva de calibración de ácido ascórbico por el método ABTS. Parámetros de la curva: $y = -0.0576x + 0.76$. Coeficiente de correlación: $R^2: 0.9962$

ANEXO IV. Curva de calibración para DPPH

Reactivos:

Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich), Ácido L(+)-ascórbico (Thermo Scientific Chemicals) y metanol (Merck).

Material:

Espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Visible, celdillas de acrílico de 10 mm de espesor Hellma®, micropipetas DLAB® 10-100 µL y 100-1000 µL, balanza analítica Citizen® con una precisión de 0.0001 g.

Preparación de los reactivos:

- Solución DPPH•: se pesaron 6.9 mg del radical DPPH• y se disolvieron en 100 mL de metanol. La solución se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia de 1.8 ± 0.02 a una longitud de onda de 520 nm. Esta solución es estable durante 12 h al resguardo de la luz (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Preparación de la curva de calibración

Se realizó una solución patrón de ácido ascórbico a una concentración de 1.66 mg/mL. Se prepararon diluciones de 10–100 µg/mL por triplicado. Cada punto de la recta de preparación colocando 400 µL de cada dilución de ácido ascórbico y 3 mL de la solución del radical DPPH• ajustado a una absorbancia de 1.80 ± 0.02 . La mezcla se agitó durante 30 s, se dejó en oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a los 20 min a una longitud de onda de 520 nm (Figura 39).

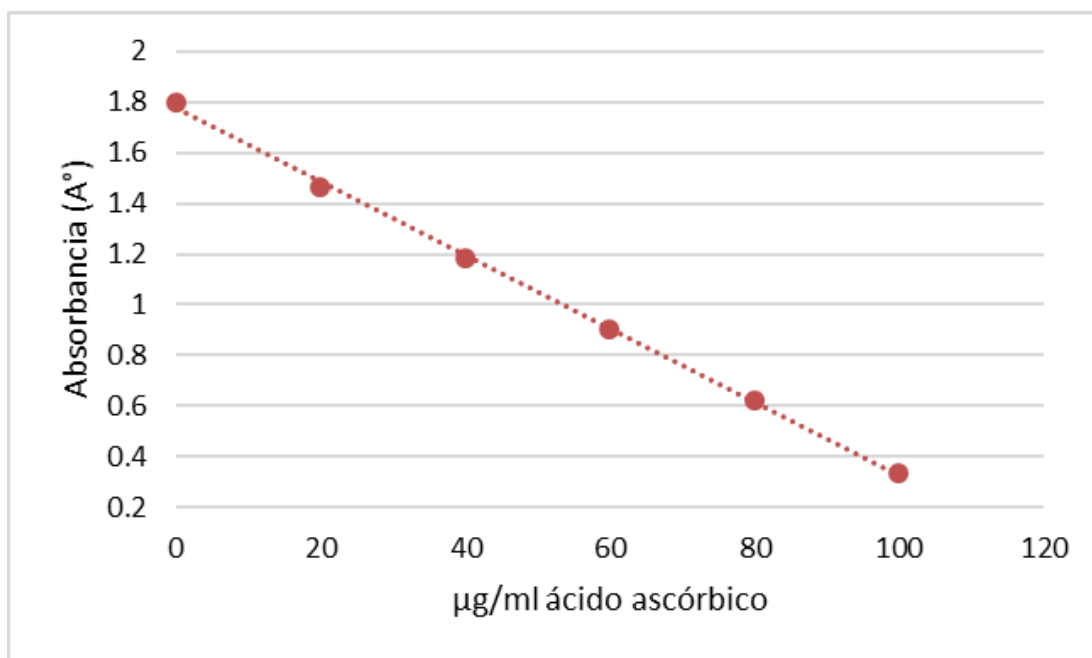


Figura 39. Curva de calibración de ácido ascórbico para el método DPPH. Parámetros de la curva: $y = -0.2894x + 2.0615$. Coeficiente de correlación: $R^2: 0.9989$.

ANEXO V. Curva de calibración para Contenido Fenólico Total (CFT)

Reactivos:

Folin-Ciocalteu (Fluka-chemicals), ácido gálico (Sigma-Aldrich), carbonato de calcio CaCO (CTR-Scientific) y metanol (Merck).

Material:

Espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Visible, celdillas de acrílico de 10 mm de espesor Hellma®, micropipetas DLAB® 10-100 µL y 100-1000 µL, balanza analítica Citizen® con una precisión de 0.0001 g.

Preparación de los reactivos:

- Solución carbonato de calcio (CaCO₃) al 2%: se pesaron 0.2 g de CaCO₃ y se disolvieron en 10 mL de agua destilada.
- Solución Folin-Ciocalteu al 10%: se tomaron 20 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se disolvieron en 180 mL de agua destilada.

Preparación de la curva de calibración:

Se realizó una solución patrón de ácido gálico, para la cual se pesó 0.1 g de ácido gálico y se diluyó en 10 mL de metanol, partiendo de esta solución se realizaron diluciones de 4 – 32 µg/mL. Para cada punto de la recta se tomaron 90 µL de las diluciones de ácido gálico, se agregaron 180 µL de la solución de Folin.Ciocalteu al 10% y 1 mL de la solución de CaCO₃ al 2%, la mezcla se incubó a 40 °C durante 1 hora, posteriormente se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Todos los puntos de la curva de calibración se realizaron por triplicado (Figura 40).

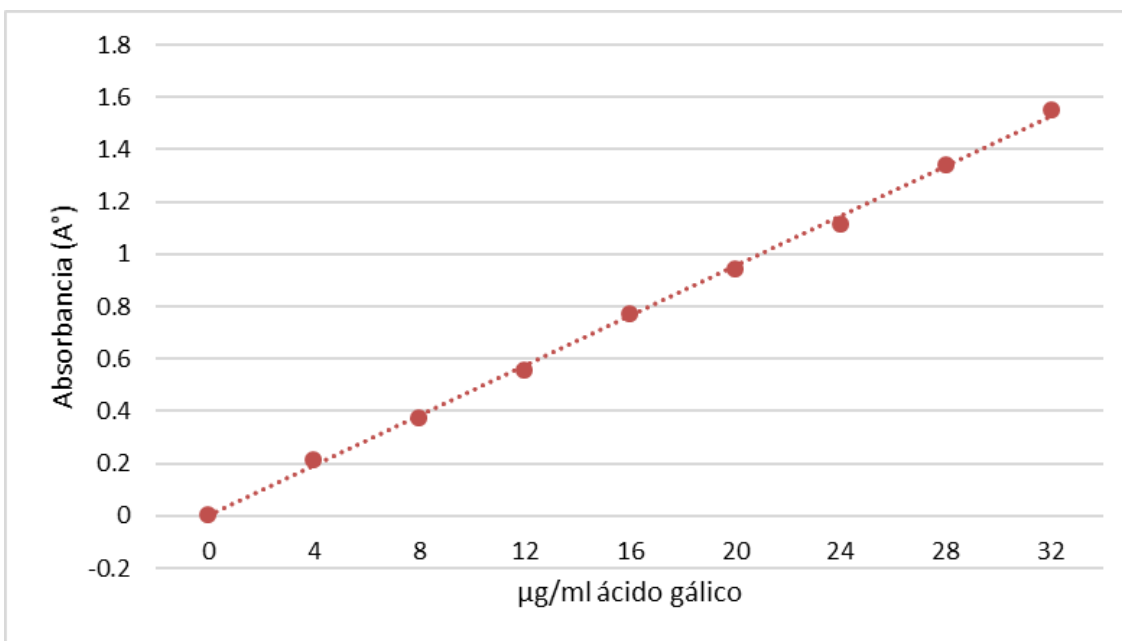


Figura 40. Curva de calibración para el CFT.

Parámetros de la curva: $y = 0.1909x - 0.1909$. Coeficiente de correlación: $R^2: 0.9989$.

ANEXO VI. Curva de calibración para Contenido de flavonoides

Reactivos:

Cloruro de aluminio (AlCl_3) (Sigma-Aldrich), Nitrito de sodio (NaNO_2) (Fermont), hidróxido de sodio (NaOH) (CTR-Scientific), Catequina (Sigma-Aldrich) y Metanol (Merck).

Material:

Espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Visible, celdillas de acrílico de 10 mm de espesor Hellma®, micropipetas DLAB® 10-100 μL y 100-1000 μL , balanza analítica Citizen® con una precisión de 0.0001 g.

Preparación de los reactivos:

- Solución cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10 %: se pesó 1 g de AlCl_3 y se disolvió en 10 mL de agua destilada desionizada.
- Solución de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%: se pesaron 0.5 g de NaNO_2 y se disolvieron en 10 mL de agua destilada desionizada.
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M: se pesaron 3.9 g de NaOH y se disolvieron en 100 mL de agua destilada desionizada.

Preparación de la curva de calibración:

Se preparó una solución patrón de catequina a 0.1 mg/mL, partiendo de esta solución se prepararon diluciones en un rango de 20- 100 µg/mL. Cada punto de la recta de preparo colocando 500 µL de las diluciones de catequina, se adicionaron 75 µL de NaNO₂ al 5%, transcurridos 6 min se agregaron 150 µL de AlCl₃ al 10%, se dejó reposar durante cinco min y se adicionaron 500 µL de NaOH 1M. Inmediatamente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y se tomó una segunda lectura a los 30 min (Figura 41).

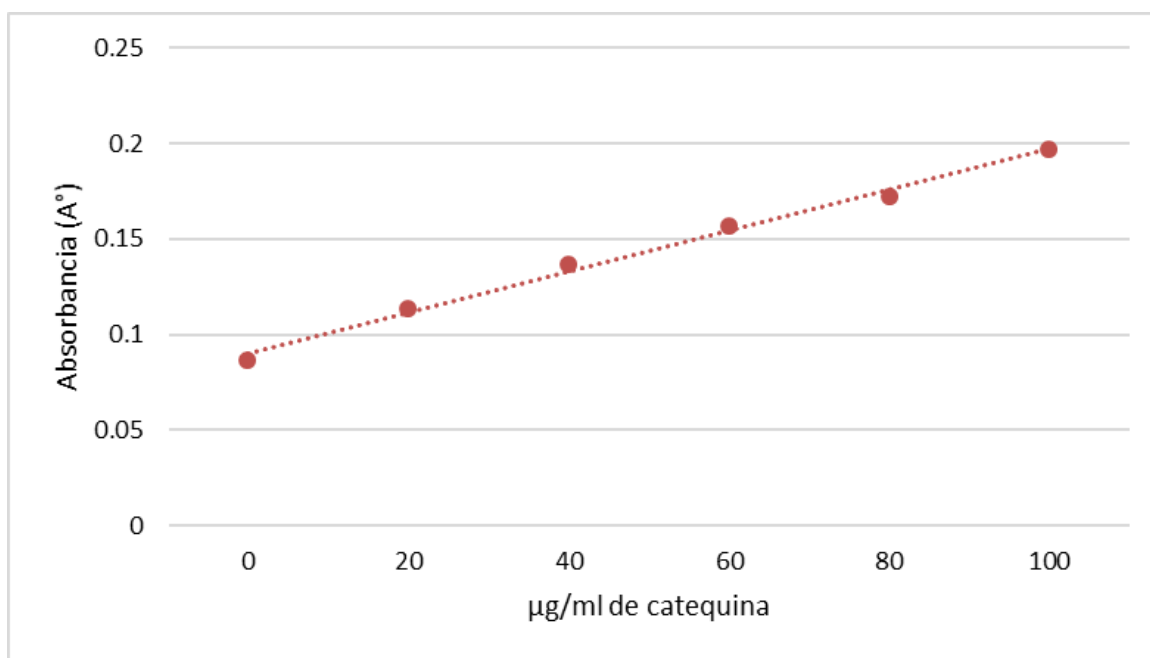


Figura 41. Curva de calibración para flavonoides.

Parámetros de la curva: $y = 0.0215x + 0.0685$. Coeficiente de correlación: $R^2: 0.9943$.