

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Defensa química en orquídeas mediada por mecanismos antioxidantes


Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Bioquímica Farmacéutica

Autor:

Liseth Carolina Bustamante García

Director:

María Elena Cazar Ramírez

ORCID:  0000-0001-5228-3514

Cuenca, Ecuador

2023-09-01

Resumen

El estrés oxidativo generado como consecuencia de la influencia de factores abióticos como la temperatura, humedad, salinidad, tipo y composición química del suelo conducen a la aparición de especies reactivas de oxígeno como respuesta inmediata. Los cambios experimentados por las plantas durante la respuesta inducen variaciones en la concentración y composición de moléculas y factores antioxidantes como resultado de procesos fisiológicos naturales, permitiendo establecer una relación directa entre la pérdida de material vegetal y un desequilibrio durante la defensa. La defensa química mediada por la producción de antioxidantes puede aproximarse mediante ensayos espectrofotométricos. El presente proyecto evaluó la respuesta antioxidante de la orquídea *Epidendrum secundum* Jacq; cultivada en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Se evaluó la captura de los radicales libres ABTS y DPPH, y se cuantificaron los compuestos fenólicos mediante el método de Folin-Ciocalteu. La actividad enzimática ante catalasa y peroxidasa se evaluó por ensayos espectrofotométricos. Los resultados señalan una actividad antioxidante y producción de compuestos fenólicos significativamente mayor en la planta cultivada *in vivo*, sugiriendo que las condiciones ambientales externas conducen a la producción de antioxidantes no enzimáticos. Para la evaluación enzimática, los resultados demuestran que las condiciones de cultivo influyen en la activación enzimática específica, mostrando una variabilidad significativa en la respuesta de catalasa y peroxidasa como respuesta al estrés. Esto indica que los tejidos desarrollados tanto *in vitro* como *in vivo* activan estrategias de defensa enzimática específicas como respuesta a las condiciones de estos cultivos ambientales y de laboratorio.

Palabras claves: orquídeas, actividad antioxidante, espectrofotometría

Abstract

Oxidative stress generated as a consequence of the influence of abiotic factors such as temperature, humidity, salinity, soil type and chemical composition lead to the appearance of reactive oxygen species as an immediate response. The changes experienced by plants during the response induce variations in the concentration and composition of antioxidant molecules and factors as a result of natural physiological processes, making it possible to establish a direct relationship between the loss of plant material and an imbalance during the defense. Chemical defense mediated by antioxidant production can be approximated by spectrophotometric assays. The present project evaluated the antioxidant response of the orchid *Epidendrum secundum* Jacq; grown under *in vitro* and *in vivo* conditions. ABTS and DPPH free radical scavenging was evaluated, and phenolic compounds were quantified by the Folin-Ciocalteu method. The enzymatic activity against catalase and peroxidase was evaluated by spectrophotometric assays. The results indicate a significantly higher antioxidant activity and production of phenolic compounds in the plant grown *in vivo*, suggesting that external environmental conditions lead to the production of non-enzymatic antioxidants. For enzymatic evaluation, the results demonstrate that culture conditions influence specific enzyme activation, showing significant variability in catalase and peroxidase response in response to stress. This indicates that tissues developed both *in vitro* and *in vivo* activate specific enzymatic defense strategies in response to these environmental and laboratory culture conditions.

Keywords: orchids, phytochemistry, antioxidant activity, spectrophotometry

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract	3
Dedicatoria	8
Agradecimiento	9
Introducción	10
Objetivos.....	12
1. Marco teórico.....	13
1.1. Diversidad de orquídeas en Ecuador.....	13
1.2. Conservación de Orquídeas en Ecuador.....	15
1.3. <i>Epidendrum</i> : generalidades, distribución y descripción botánica.....	15
1.4. El estrés oxidativo en el metabolismo vegetal.....	16
1.5. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	17
1.6. Estrés oxidativo bajo estrés abiótico.....	18
1.6.1. Influencia de la temperatura en el desarrollo vegetal.....	19
1.6.2. Estrés oxidativo y respuesta frente a la temperatura.....	20
1.7. Mecanismos de Defensa Antioxidante Vegetal.....	21
1.7.1. Antioxidantes no enzimáticos.....	23
1.7.2. Enzimas antioxidantes.....	24
1.8. Evaluación de actividad antioxidante enzimática y no enzimática.....	25
1.8.1. Ensayo de captura del radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo). Error! Bookmark not defined.	
1.8.2. Captura del catión ABTS ^{•+} (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico).....	25
1.8.3. Cuantificación de fenoles totales por métodos espectrofotométricos.....	26
1.8.4. Actividad de la enzima catalasa (CAT).....	27
1.8.5. Actividad de la enzima peroxidasa (POX).....	27
2. Metodología.....	28
2.1. Diseño y tipo de investigación.....	28
2.2. Recolección de muestras.....	28

2.3. Obtención de extractos orgánicos a partir de biomasa vegetal in vitro e in vivo para la determinación de actividad antioxidante, concentración de fenoles totales.	28
2.4. Obtención de extractos acuosos para ensayos enzimáticos.	29
2.5. Ensayos espectrofotométricos de captura de radicales libres.	29
2.5.1. Ensayo de captura del radical libre ABTS ^{•+} (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).	29
2.5.2. Ensayo de captura del radical libre DPPH [•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).	30
2.6. Cuantificación de fenoles totales por métodos espectrofotométricos.	31
2.7. Actividad enzimática de extractos acuosos vegetales.	32
2.7.1. Inhibición de la enzima peroxidasa (POX).	32
2.7.2. Inhibición de la enzima catalasa (CAT).	33
2.8. Análisis estadístico de datos.	34
3. Resultados.	35
3.1. Captura de radicales libres por extractos orgánicos de <i>E. Secundum</i>, cultivados en condiciones in vivo e in vitro.	35
3.2. Cuantificación de fenoles totales por métodos espectrofotométricos.	35
3.3. Actividad enzimática de extractos acuosos vegetales.	36
4. Discusión.	37
5. Conclusiones.	40
6. Recomendaciones.	41
Referencias.	42
Anexos.	49

Índice de figuras

Figura 1. <i>Epidendrum secundum</i>	11
Figura 2. Estructura de puntos de Lewis de oxígeno triplete y especies reactivas de oxígeno.....	13
Figura 3. Generación de ERO inducida por estrés ambiental, defensa antioxidante y muerte celular en plantas.....	17
Figura 4. Estructura del DPPH• antes y después de la reacción con el antioxidante.....	21
Figura 5. Estructura del ABTS ^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante.....	22
Figura 6. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	23
Figura 7. Reacción de degradación del peróxido de hidrógeno.....	23
Figura 8. Organización de la microplaca para desarrollar el ensayo de captura de ABTS.....	26
Figura 9. Organización de la micro placa para desarrollar el ensayo de captura de DPPH.....	27
Figura 10. Organización de la microplaca para desarrollar el ensayo de concentración de fenoles totales.....	28

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados de ensayos espectrofotométricos de captura de radicales libres ABTS y DPPH. (*: promedio de tres repeticiones. Valor p obtenido de prueba t de Student, al 95% de confianza)	31
Tabla 2. Resultados de ensayos espectrofotométricos de cuantificación de fenoles totales. (*: promedio de tres repeticiones. Valor p obtenido de prueba t de Student, al 95% de confianza)	31
Tabla 3. Resultados de ensayos espectrofotométricos de actividad enzimática catalasa y peroxidasa. (*: promedio de tres repeticiones. Valor p obtenido de prueba t de Student, al 95% de confianza)	32

Dedicatoria

El presente trabajo investigativo lo dedico a:

Dios, principalmente por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados en mi vida.

A mi madre Gloria, por ser el soporte principal en mi vida y apoyarme en cada paso. Su amor, trabajo y sacrificio me han permitido ser lo que soy ahora.

A mi tío Rubén, que se ha convertido en un padre para mí, gracias a su apoyo continuo, he podido cumplir este sueño.

A mi amigo Freddy, que a lo largo de los años se ha convertido en mi hermano y un apoyo fundamental.

A mis dos mascotas, Liza y Crisper, que han estado en todas las noches de desvelo acompañándome.

Agradecimiento

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida. A toda mi familia por estar siempre presentes, especialmente a mi madre, mi tío que gracias a su apoyo he podido cumplir mis metas y sueños, constituyendo el pilar fundamental de mi vida, sin ellos nada de esto hubiese sido posible. A mi amigo Freddy, porque a lo largo de los años me ha apoyado incondicionalmente como un hermano, constituyéndose para un ejemplo de lucha y superación.

De igual manera mi profundo y sincero agradecimiento y admiración a la Dra. María Elena Cazar Ramírez, principal colaboradora durante todo este proceso, quién con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración me permitió desarrollar este trabajo de titulación.

De igual manera mis agradecimientos a mis asesores de tesis, por ayudarme en el proceso.

Introducción

Las orquídeas son una de las familias de angiospermas con más variedad a nivel mundial, que se encuentra dentro del grupo más grande de plantas con flores dentro del reino vegetal. Al adaptarse a la mayor parte de climas, principalmente los neotropicales, el 73% de estas especies se desarrolla en estas condiciones (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018; Córdova, 2020). En Ecuador se registran hasta la fecha aproximadamente 4.032 especies, de las cuales 1.714 son endémicas. Los géneros más representativos de orquídeas son *Pleurothallidinae* (65% de abundancia), *Laeliinae* (12%), *Oncidiinae* (9%). El género *Epidendrum* se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país, con más de 1000 especies en diferentes pisos climáticos (Córdova, 2020; Mites Cadena & Oña, 2018).

Actualmente, las poblaciones de orquídeas silvestres se encuentran diezmadas por la alteración de sus hábitats a consecuencia del calentamiento global por un desequilibrio en el conocido como efecto invernadero produciendo el conocido como cambio climático, anudado a esto el efecto de actividades antrópicas como la tala de bosques, extracción minera, la degradación de suelos y la colecta indiscriminada como plantas ornamentales y medicinales conducen a la alteración de los ecosistemas, acidificación y contaminación del agua gracias a la concentración de dióxido de carbono en el aire, muerte, migración y extinción de diferentes especies vegetales de animales. Por su importancia creciente y la amenaza constante, las orquídeas se encuentran catalogadas acorde a categorías y criterios de La Lista Roja de UICN permitiendo clasificar especies a alto riesgo de extinción global. Dividiendo especies en nueve categorías: no evaluado, datos insuficientes, preocupación menor, casi amenazado, vulnerable, en peligro, en peligro crítico, extinto en estado silvestre y extinto (Buyun et al., 2021; Pant, 2013).

Nuestro país se ha convertido en el foco central de investigación, enfocada a establecer métodos cada vez más especializados de conservación, determinación de factores implicados en el estrés de la planta y su influencia en el desarrollo (Ministerio del ambiente, 2023; Julsrigival et al., 2020; Endara et al., 2017; Mites Cadena & Oña, 2018; Pant, 2013; Fernandes et al., 2007). Los esfuerzos investigativos han cobrado relevancia científica en los últimos años debido al valor agregado de las orquídeas a nivel ambiental, ya que están implicadas en el mantenimiento de la fauna, especialmente de insectos polinizadores especializados y el trabajo simbiótico con ciertos hongos que le suministran. Por lo que cautivan no solamente a muchos investigadores, cultivadores y amantes de la naturaleza también juegan un rol importante en la naturaleza

(Gutiérrez et al., 2014; Buyun et al., 2021). En el sector florícola, conferido por la gran variedad en formas y colores de sus inflorescencias, y sus posibles aplicaciones farmacológicas y cosméticas (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018; Córdova, 2020). Como consecuencia de lo señalado, las investigaciones actuales buscan establecer métodos de conservación a nivel laboratorio y ambiental, evaluando condiciones para el desarrollo de estrategias de recuperación tanto in situ como ex situ (Buyun et al., 2021; Pant, 2013).

A nivel ambiental, los factores que influyen sobre el desarrollo vegetal son bióticos y abióticos. El ámbito de la presente investigación involucra a factores abióticos, como la temperatura que inducen el estrés oxidativo. No obstante, es necesario indicar los factores abióticos con mayor influencia en el desarrollo de las plantas: estrés hídrico, salinidad, variaciones de temperatura a nivel diurno y nocturno, metales tóxicos, inundaciones, etc. Estas variables influyen directamente sobre la tasa de supervivencia de las plantas, sumadas a los efectos del cambio climático y la alta tasa de deforestación que está sufriendo nuestro planeta, constituyen los principales factores asociados a la disminución de especies vegetales. Por este motivo es urgente buscar medidas de remediación, restauración y conservación de especies vegetales (Mites Cadena & Oña, 2018).

El presente trabajo se enfoca en la diferenciación de las respuestas fisiológicas y antioxidantes, asociadas a las condiciones de crecimiento de orquídeas en ambientes naturales, en comparación con cultivos *in vitro*. (Murillo-Talavera et al., 2016; Venturieri & Arbieto 2011 y Jayaprakasha, 2004; Ali et al., 2005). Los resultados constituyen una primera aproximación a la evaluación de la respuesta antioxidante de plantas en diferentes condiciones de cultivo, utilizando como organismo modelo a la orquídea *Epidendrum secundum*.

Objetivos

La investigación planteada se enmarcó en los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Evaluar la respuesta antioxidante de orquídeas frente al estrés oxidativo, utilizando como organismo modelo a *Epidendrum secundum*, orientada a mejorar las condiciones de cultivo *in vitro*.

Objetivos específicos

- Evaluar la posible relación entre la influencia del medio ambiente *in vivo* e *in vitro* durante el desarrollo de *Epidendrum secundum* frente a los diferentes factores abióticos y su papel en el estrés oxidativo.
- Interpretar los resultados obtenidos en el contexto de los cultivos *in vitro*, con el fin de optimizar la viabilidad de las especies en estas condiciones de crecimiento.

1. Marco Teórico

1.1. Diversidad de orquídeas en Ecuador.

Ecuador es considerado uno de los países más diversos y ricos en cuanto a flora y fauna. A partir del año 2013 nuestro país recibió el título como el país más megadiverso por unidad de área, al poseer una extensión de 256.370 km², representando apenas 0,02% de la superficie terrestre del planeta, tiene el 7,6% de la diversidad vegetal total del planeta distribuida por km² (Thapa et al., 2020; Mencias & Salazar, 2018; Freuler, 2008). Nuestro país alberga 18.198 especies de plantas vasculares, de las cuales 17.748 son nativas. Según Endara et al. (2017) del total de plantas identificadas, 4.032 pertenecen a la familia orquidácea, de las especies clasificadas hasta el momento, 1.707 son endémicas y más de 400 están en proceso de identificación y descripción (Gutiérrez et al., 2014; Jiménez, 2014).

Esta riqueza vegetal se debe principalmente a la generación de climas y microclimas, como consecuencia de la ubicación ecuatorial, la confluencia de sistemas montañosos, la coincidencia entre las corrientes de Humboldt y del Niño, sumado al nivel de lluvias en la Amazonia (Jiménez, 2014). Estas características dividen zonas áridas con lluvias ocasionales hasta selvas tropicales, generando 24 zonas geográficas, lo cual incide en la presencia de aproximadamente 200.000 de especies vasculares, las cuales incluyen aproximadamente 4.000 especies de orquídeas (Ministerio del ambiente, 2023; Molina Sandoval, 2020). Los factores descritos convierten a Ecuador en una de las regiones geográficas que alberga a cuatro de las cinco subfamilias de orquídeas que existen a nivel mundial (Buyun et al., 2021; Molina Sandoval, 2020). Un tercio del total de plantas endémicas en Ecuador la constituyen las orquídeas, el número está en constante cambio debido a nuevas investigaciones taxonómicas y revisiones en herbarios. Los avances filogenéticos y moleculares y las exploraciones llevadas a cabo en nuestro país contribuyen al aumento de número de especies identificadas, así como la eliminación de ciertas especies (Endara et al., 2017).

La mayor parte de orquídeas identificadas en Ecuador pertenecen a los géneros *Lepanthes*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Epidendrum* y *Masdevallia*. Taxonómicamente, el 65% de estas especies pertenecen a la subtribu Pleurothallidinae, 12% a Laeliinae y 9% a Oncidiinae. Su distribución es amplia, va desde 0 a 4500 m.s.n.m., presentando una mayor abundancia a alturas de 1.500 a 2.500 m.s.n.m, especialmente en zonas montañosas de la Sierra Ecuatoriana (Jiménez, 2014;

Olivares, 2021). Estas plantas constituyen un valioso insumo para el sector florícola, dadas las características únicas de sus inflorescencias. Adicionalmente, se han descrito diversas actividades farmacológicas y cosméticas (Gualpa, 2013).

La importancia de la conservación a nivel ambiental consiste en el mantenimiento de la flora por la conservación de las mismas y el mantenimiento de animales, especialmente de insectos polinizadores especializados, cuya supervivencia dependen únicamente de estas especies (Gutiérrez et al., 2014). Generan un vínculo cada vez más estrecho con determinadas especies de insectos polinizadores, de tal manera que evolucionan a la par y con el tiempo generan una relación de dependencia, por lo que se hacen y llegan a formar parte del ciclo de estas especies. La atracción que ejercen las orquídeas sobre los insectos favorece la polinización cruzada, promoviendo la diversidad genética al interior de las poblaciones. La coevolución es la selección recíproca entre dos o más poblaciones; entre plantas e insectos que se caracteriza por ser un proceso estrecho y de alta importancia ecológica, ya que, gracias a una serie de adaptaciones coordinadas se han desarrollado varios mecanismos de interacción favorables. Uno de los papeles de este fenómeno en la evolución de las angiospermas ha sido la aparición y desarrollo de las flores cíclicas o verdaderas, resultantes de las presiones de herbivoría y necesidades reproductivas.

La otra característica que las hace tan atractivas es el hecho de trabajar de forma simbiótica con ciertos hongos que le suministran el alimento hasta que puedan desarrollarse por sí mismas en el medio ambiente, ya que estas carecen de tejidos de reserva en etapas tempranas en su forma de semilla. Por lo que cautivan no solamente a muchos investigadores, cultivadores y amantes de la naturaleza también juegan un rol importante en la naturaleza (Gutiérrez et al., 2014; Buyun et al., 2021). Las orquídeas se caracterizan por producir una gran variedad de aromas característicos, asociados a la producción de compuestos volátiles. (Gutiérrez et al., 2014). A nivel químico, la importancia que cobran las orquídeas es amplia, no obstante, existen pocos estudios de caracterización química de estas especies. En este ámbito se requiere plantear estudios que enlacen la caracterización química con la actividad biológica y el rol que cumplen los metabolitos secundarios en estrategias de adaptación y defensa vegetal (Mencias & Salazar, 2018).

1.2. Conservación de Orquídeas en Ecuador.

A pesar de su abundancia de especies y distribución, las orquídeas ecuatorianas enfrentan amenazas asociadas a actividades antrópicas como: tala indiscriminada de bosques, minería, comercio ilegal, invasión de tierras, incendios forestales, actividades petroleras (Pant, 2013; Jimenez, 2014; Olivares, 2021). De acuerdo con Endara et al. (2017), aproximadamente 1.455 de las especies pertenecientes a los géneros de *Lepanthes* (240 spp.), *Pleurothallis sensu lato* (215 spp.), *Stelis sensu stricto* 223 spp., *Epidendrum* (205 spp.) y *Masdevallia sensu lato* (151 spp.) se encuentran amenazadas, un 2% están catalogadas como en peligro crítico, 11% en peligro y un 87% están dentro de las especies vulnerables.

De los datos proporcionados hasta la fecha se conoce que solo el 13% de la población de orquídeas se encuentra en áreas protegidas, y con posibilidad de conservación, sin embargo, la población restante se encuentra en constante riesgo y peligro. La idea de que especies de gran importancia medicinal, cultural y ambiental se vayan perdiendo es desoladora, lo que realmente nos hace mirar y darnos cuenta de si se está efectivizando los protocolos de conservación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador (SNAI), por lo que resulta imperante implementar protocolos de conservación, investigación de tal manera que se incentive la exploración y estimular la necesidad de investigación del rol de esta especie en los tres campos ya mencionados (Endara et al., 2017; Pant, 2013).

1.3. *Epidendrum*: generalidades, distribución y descripción botánica.

Epidendrum es considerado uno de los géneros más diversos. Se trata de plantas herbáceas, epífitas o litófitas que se distribuyen ampliamente debido a su gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales, distribuyéndose desde llanuras y valles del Pacífico hasta las regiones altas del Amazonas. Esta diversidad se debe a la gran facilidad de adaptarse a los diferentes climas. El género *Epidendrum* es utilizado como modelo en la mayoría de las investigaciones relacionadas con estrategias de evolución, adaptación, reproducción a causa de una extensa variación morfológica, variabilidad genética, función en la ecología y su fácil propagación. La taxonomía del género *Epidendrum* está clasificada de la siguiente manera: clase Equisetopsida, subclase *Magnoliidae*, superorden *Liliana*, orden *Asparagales*, familia *Orchidaceae*, género *Epidendrum* (Thangavelu & Shenbagam, 2017; Mencias & Salazar, 2018).

Las plantas de este género se caracterizan por la formación de pseudobulbos. La forma de sus flores, colores y tamaño son variados en función de la especie. Resupinadas o no, las inflorescencias pueden ser del tipo carimbosa, paniculada, racemosa o terminal. Sus hojas son dísticas, las brácteas florales son pequeñas o iguales en comparación con el ovario, los pétalos son libres y más angostos que los sépalos, el labelo presente está completamente adherido a la parte ventral de la columna que es áptera y lobulada en el ápice (Mencias & Salazar, 2018; Endara et al., 2017; Olivares, 2021).



Figura 1. *Epidendrum secundum*. Fuente: (*Epidendrum secundum*, 2018)

1.4. El estrés oxidativo en el metabolismo vegetal.

En condiciones normales de desarrollo, las plantas están expuestas a diversas situaciones de estrés que afectan negativamente al desarrollo y la productividad normal de las plantas. Las plantas se ven afectadas por dos tipos de estrés: estrés biótico, causado por infecciones virales, bacterianas y fungales; y estrés abiótico, causado por condiciones de salinidad, variaciones de temperatura, sequía, metales pesados en el suelo, radiación ultravioleta. El estrés biótico y abiótico induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los tejidos vegetales (Cacique et al., 2020; Río, 2013). La respuesta a la presencia de ERO implica la biosíntesis de moléculas, como consecuencia a la respuesta de defensa y protección frente al estrés (Robustelli della Cuna et al., 2019).

La respuesta en las plantas depende principalmente de los ERO, los cuales actúan en base a dos estrategias. La primera es la señalización a concentraciones bajas de radicales libres y la segunda es causar daño permanente en las células por una exposición prolongada al estrés, generando altas concentraciones al interior de la célula. La rapidez y eficacia de estas respuestas dependerá del nivel de respuesta fisiológica, lo que determina la viabilidad de una especie determinada. En el proceso se observan cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento vegetal (Río, 2013). Mientras el sistema funcione, las reacciones de transferencia de electrones se mantienen en equilibrio entre la generación de ERO y el sistema antioxidante, permitiendo la eliminación de estas especies reactivas de oxígeno. Las señalizaciones redox internas se mantienen adecuadas mientras la concentración basal de ERO se mantengan en concentraciones superiores a las concentraciones citostáticas o en concentraciones inferiores a las citotóxicas (Hasanuzzaman et al., 2020).

1.5. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se producen como consecuencia del metabolismo aeróbico en todos los orgánulos intracelulares (cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y membrana plasmática), mediados por reacciones bioquímicas, cadenas de transporte de electrones, radiación ultravioleta-B e irradiaciones ionizantes. Estos estímulos producen un cambio en la configuración electrónica del oxígeno haciéndolo radicalario. El sistema funciona como una cadena en la que los radicales formados generan peróxido de hidrógeno a partir de la dismutación del superóxido, e hidroxiperoxilo a través de las isoformas de la superóxido dismutasa (SOD), oxidasas NADPH y la actividad de las peroxidasas de clase III que contienen un grupo hemo (POX). Los cloroplastos son los organelos de mayor producción de ERO, generando entre 30 a 100 veces más que las mitocondrias. (Hasanuzzaman et al., 2011, Hasanuzzaman et al., 2020).

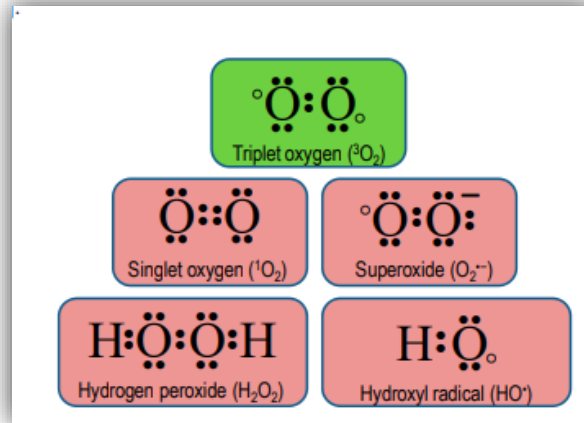


Figura 2. Estructura de puntos de Lewis de oxígeno triplete y especies reactivas de oxígeno. Fuente: (Hasanuzzaman et al., 2020).

1.6. Estrés oxidativo bajo estrés abiótico.

La generación de especies reactivas de oxígeno está directamente relacionada con el tipo de estímulo que se recibe. La mayor cantidad de estas ERO se producen en los cloroplastos y como estos están relacionados con la luz constituye el principal factor de estrés dependiendo de la cantidad de luz que reciben las plantas. Las constantes variaciones a nivel ambiental de la temperatura van a influir significativamente en el equilibrio y el mantenimiento de la integridad celular (Hasanuzzaman et al., 2020). El proceso da lugar a la formación de ERO (oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\bullet)), en respuesta al complejo sistema de factores presentes en el ambiente, anudado a las condiciones imprescindibles y el cambio climático global, en conjunto crea una serie de situaciones adversas, que se denominan colectivamente estrés abiótico (Hasanuzzaman et al., 2011; Río, 2013; Caverzan et al., 2012).

El estrés abiótico genera una respuesta inmediata, que modifica el metabolismo de las plantas, afectando su crecimiento, desarrollo y productividad. Si la exposición es prolongada, las células se ven afectadas produciendo peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas, daños en los ácidos nucleicos, la inhibición de enzimas. Los cambios anatómicos y morfológicos son una disminución del tamaño celular, reducida conductancia y cierre estomático, alteración de la permeabilidad de la membrana celular, aumento de la densidad en estomas y tricomas y los vasos de xilema se ve aumentado en tamaño. La combinación de estos cambios produce la activación

de la vía de la muerte celular programada que conduce a la pérdida del material vegetal. (Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016; Pooja & Munjal, 2019).

El estrés oxidativo constituye un proceso regulado, y el equilibrio entre las ERO y la capacidad antioxidante determina el destino de la planta (Río, 2013; Caverzan et al., 2012; Hussain et al., 2019). El estrés de las plantas puede variar en función de los tipos de agentes estresantes y del periodo de exposición (Hasanuzzaman et al., 2011; Hussain et al., 2019; Río, 2013; Caverzan et al., 2012).

1.6.1. Influencia de la temperatura en el desarrollo vegetal.

El desarrollo normal de la vida silvestre se da bajo ciertas condiciones específicas, en particular para la temperatura, se considera óptima a 25 °C, donde las funciones vitales vegetales se mantienen. El cambio permanente en la temperatura media global en los últimos años causa daño cuando las plantas han sido expuestas a una determinada temperatura de estrés por un tiempo prolongado. La contaminación creciente causada por el hombre ha generado un aumento del 0,07 °C cada década durante los últimos 150 años. La proyección de acuerdo a los datos estima que para el año 2050 la temperatura global se incrementará en 1 °C y en 3 °C para el 2100. La variación completa dentro del sistema en las plantas depende de la estación del año o las fluctuaciones diurna o nocturnas que despliegan la alta plasticidad estructural fisiológica (Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016; Río, 2013; Perez, 2010).

Las variables implicadas que determinan la supervivencia de la especie en estudio, etapas de desarrollo y ciclos fenológicos dependen del tiempo de exposición, tasa de incremento de la temperatura, y la máxima temperatura a la que son tolerantes (Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016). Se reconocen cuatro tipos de estrés térmico:

1. Estrés producido por altas temperaturas por tiempos prolongados.
2. Estrés producido por episodios frecuentes de exposición a altas temperaturas o también conocido como "heat shock".
3. Estrés producido por enfriamiento (0 °C-10 °C).
4. Estrés producido por temperaturas elevadas (superiores a los 50 °C).

(Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016)

1.6.2. Estrés oxidativo y respuesta frente a la temperatura.

El crecimiento y desarrollo de las plantas dependen directamente de la temperatura que actúa a través de los fotosistemas PS (I) Y PS (II). A altas temperaturas, un exceso de energía de fotones sobre el fotosistema (PS II) genera una fotoinhibición. El estrés generado por la temperatura y la consecuente pérdida del transporte de electrones fotosintéticos se atribuye a la termolabilidad de PS II, que genera una serie de reacciones que conducen a la generación de las ERO (1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot}) (Ali et al., 2005). El resultado final es una serie de señales que activan la expresión de genes y síntesis de moléculas denominadas antioxidantes. (Ali et al., 2005; Caverzan et al., 2012). Los primeros sistemas en reaccionar son la pared celular, aparato de Golgi, cloroplastos, tonoplasto, retículo endoplásmico (Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016; Hasanuzzaman et al., 2011; Caverzan et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2020; Pooja & Munjal, 2019). A nivel celular el estrés celular afecta principalmente moléculas de tipo proteico, aumento de la concentración de ácidos grasos que causa la fluidificación y aumento en la permeabilidad de los lípidos, favoreciendo la pérdida de los electrolitos (Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016).

Dos tercios de la masa terrestre está sometida a cambios bruscos de temperatura debido al constante cambio. Esta proporción es sometida a temperaturas por debajo del punto de congelación $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La disminución de la temperatura genera un aumento de la solubilidad O_2 , lo que consecuentemente aumenta su concentración que conduce a la mayor producción de $O^{\cdot-}$, H_2O_2 , 1O_2 , y OH^{\cdot} . El estrés por bajas temperaturas afecta más a las plántulas, con síntomas notables en las plantas que incluyen lesiones superficiales, aspecto empapado de agua, desecación, decoloración, descomposición de los tejidos y senescencia acelerada. Los daños en las membranas a causa de la deshidratación aguda se asocia a la congelación, transición física de la membrana de una fase líquida-cristalina flexible a una fase de gel sólido que causa una mayor permeabilidad de la membrana y la fuga de iones. En casos extremos, las consecuencias son esterilidad, senescencia acelerada y la muerte de la planta (Hasanuzzaman et al., 2011).

La respuesta, la tasa de supervivencia y la tolerancia al estrés frente a variaciones de temperatura en plantas de cultivo se asocia con un aumento de antioxidantes (Almeselmani et al. 2006; Babu y Devraj 2008; Almeselmani et al. 2009). Un mayor contenido de enzimas antioxidantes de defensa se correlaciona con una mayor tolerancia a las variaciones de temperatura. Los estudios sobre diferentes cultivares aclimatadas y tolerantes frente a las no aclimatadas sugieren que las primeras tienen una menor producción de ROS como resultado de una mayor síntesis de ascorbato (AsA)

y glutatión (GSH) (Xu et al. 2006). La exposición a altas temperaturas muestra un aumento significativo en la actividad de superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) mientras que glutatión reductasa (GR) y peroxidasa (POX) disminuyó, en contraposición con el desarrollo a bajas temperaturas que mostraron un aumento en la actividad de SOD, CAT, APX y GR en cultivares tolerantes. En cultivares susceptibles hay una reducción significativa en las actividades de CAT, GR y POX en el tratamiento de alta temperatura. Gechev et al., 2010 informaron que CAT y dehidroascorbato reductasa (DHAR) son más fuertemente afectados por el enfriamiento (5 °C) y pueden ser el factor limitante del sistema antioxidante a bajas temperaturas (Hasanuzzaman et al., 2020; Pooja & Munjal, 2019; Hasanuzzaman et al., 2011).

1.7. Mecanismos de Defensa Antioxidante Vegetal.

Un antioxidante, como definición, es cualquier molécula de origen natural cuya función es evitar o disminuir la acción ejercida por los radicales libres que causan daño directo en las células al tener un electrón no apareado que se encuentra libre, siendo este altamente inestable y reactivo. Su función la llevan a cabo al donar electrones, lo que evita las reacciones de óxido-reducción (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018; Mencias & Salazar, 2018; Pérez, 2016; Moattar et al., 2017; Molina Sandoval, 2020).

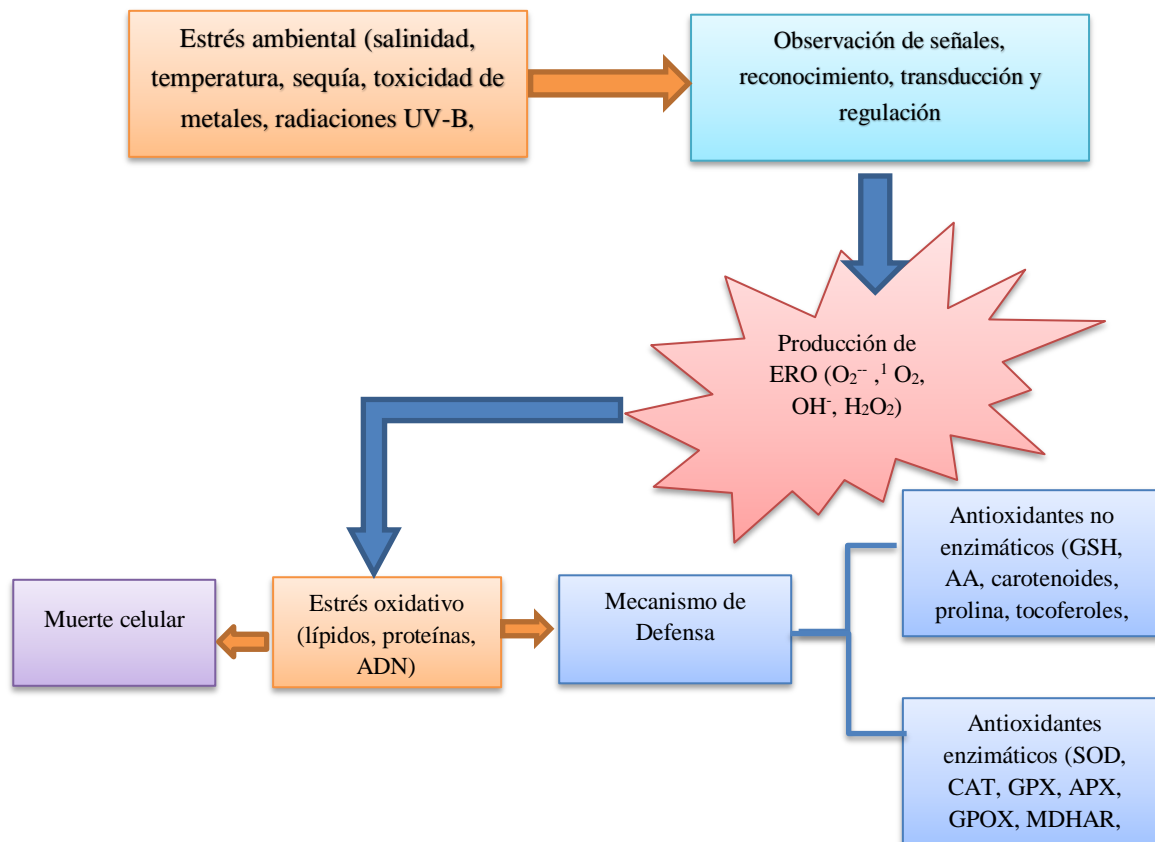


Figura 3. Generación de ERO inducida por estrés ambiental, defensa antioxidante y muerte celular en plantas. Fuente: (Xie et al., 2019)

En los organismos vivos estas moléculas antioxidantes son productos directos del metabolismo, que se caracterizan por ser diferente es en función de su composición química, función y localización. Este metabolismo es de dos tipos primario y secundarios, el primario está relacionado principalmente en la producción de sustancias implicadas en el desarrollo y crecimiento, entre las que tenemos lípidos, carbohidratos, aminoácidos, proteínas y vitaminas; mientras que en el metabolismo secundario la producción de estas moléculas están relacionadas con la interacción de la planta con el medio ambiente en el que se desarrolla así como factores genéticos y fisiológicos, lo que le confieren a sus moléculas estructuras muy complejas y composición química variada (diversos grupos funcionales) (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018; Caverzan et al., 2012).

Con el fin de entender la naturaleza de estas moléculas producto del metabolismo secundario implicadas en la defensa y en el proceso de eliminación de radicales libres, se clasifican en dos grupos claramente diferenciados, moléculas de defensa antioxidante enzimáticas y no enzimáticas (Robustelli della Cuna et al., 2019). El sistema antioxidante funciona de tal manera que las moléculas se cooperan unas con otras, entre ellas es importante mencionar los sistemas de defensa enzimáticos como lo son la superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1), catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7) y los sistemas no enzimáticos que coordinan funciones de protección entre las que destacan el ascorbato, fenoles, glutatión, carotenoides y antocianinas que participan en la defensa antioxidante de manera que actúan como eliminadoras de los ERO (Hasanuzzaman et al., 2020; Moattar et al., 2017; Caverzan et al., 2012; Robustelli della Cuna et al., 2019).

1.7.1. Antioxidantes no enzimáticos.

La principal defensa del sistema no enzimático la constituyen los compuestos fenólicos. El grupo contiene más de 9.000 compuestos diferentes en cuanto a estructura y peso molecular, propiedades fisicoquímicas y biológicas resultantes (Crozier et al. 2006). Estas moléculas se obtienen a través de la vía del ácido shikímico o la vía del malonato/acetato. Los estímulos para la síntesis de estas moléculas son principalmente estímulos endógenos como producto del desarrollo normal de la planta, así como diferentes estímulos ambientales como la luz, temperatura, heridas (Ahmad et al., 2012).

Químicamente, se caracterizan por poseer un grupo funcional hidroxilo unido a un anillo aromático, dentro de este grupo el compuesto más representativo es el fenol; de acuerdo a este criterio la clasificación se basa en el número de carbonos, así tenemos fenoles simples, fenoles ácidos, acetofenonas y ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, flavonoides, biflavonilos, benzofenonas, xantonas, estilbenos, quinonas y betacianinas. Hay un grupo de compuestos que también pertenecen a este grupo que se caracterizan por ser polímeros con estructuras más complejas, así tenemos a los lignanos, neolignanos, taninos y flobafenos (Córdova, 2020; Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018).

Gracias a la gran diversidad de estos compuestos en la naturaleza, las funciones que desempeñan son variadas (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018). Las funciones que ejercen estos están directamente relacionados con su capacidad antioxidante, actúan como inhibidores del crecimiento

y de la germinación vegetal, intervienen en la captación del 90% de la radiación al encontrarse en la superficie de las hojas, además estos les confieren a las plantas colores y olores característicos que intervienen en el proceso de polinización, participan en el proceso de competencia por territorio entre plantas, defensa contra patógenos al sintetizar fitoalexinas, que actúan como tóxicos para los microorganismos atacantes previniendo infecciones y defensa contra herbívoros al conferirles sabores y texturas amargar y que resultan desagradables para los mismos (Córdova, 2020; Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018; Ahmad et al., 2012).

1.7.2. Enzimas antioxidantes.

Las ERO juegan un papel relevante en el sistema de defensa como ya se ha mencionado, como parte del grupo el H_2O_2 participa en la síntesis de la pared celular y en la respuesta hipersensible ante el ataque de microorganismos; sin embargo, el control de la producción resulta crucial, ya que un exceso en la concentración de estos productos conduce a la producción de OH^- que son los principales agentes oxidantes de las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. En el control del H_2O_2 participan enzimas como la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) que lo degrada hasta agua y oxígeno y la peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) que necesita de un compuesto de carácter fenólico como donador de protones para generar el respectivo quinon (Rivera et al., 2005; Moattar et al., 2017; Caverzan et al., 2012).

La catalasa es una enzima conformada por un grupo hemo que contiene un átomo de hierro ferroso y un anillo de porfirina, tetrapirrol cíclico, en cada subunidad para formar el sitio activo de la enzima (Georgieva et al., 2021). Esta molécula es capaz de descomponer el H_2O_2 y eliminarlo (Jaleel et al., 2009). La CAT tiene una de las tasas de recambio más altas de todas las enzimas, ya que una molécula que puede convertir alrededor de seis millones de moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2 por minuto. Los estudios sobre las actividades de la CAT han indicado que la enzima es un componente integral de la defensa celular contra diversos estreses (Poobathy et al., 2013; Flocco & Giulietti, 2007; Hussain et al., 2019).

La Peroxidasa (POX) es una enzima catalogada como una de las más comunes y ubicuas, cuya estructura química se caracteriza por presentar en su sitio activo un grupo tanto hemo como no hemo que forma parte del sistema de defensa enzimático. Actúan de manera que oxida sustratos orgánicos catalizando la transferencia de oxígeno desde un peróxido donador, como el peróxido de hidrógeno, al sustrato, a través de una especie oxidada dentro de la enzima. Para prevenir el

daño de los ROS a los componentes celulares, las plantas han desarrollado un complejo sistema antioxidante. La eliminación de las ERO mediante una mayor activación de las enzimas antioxidantes puede mejorar la tolerancia a la temperatura (Jaleel et al., 2009; Grogan, 2012).

1.8. Evaluación de actividad antioxidante enzimática y no enzimática.

Las estrategias de defensa antioxidante de las plantas pueden ser evaluadas mediante la cuantificación de compuestos fenólicos, la capacidad de extractos orgánicos de capturar radicales libres estables y el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes en sistemas in vitro e in vivo. Los métodos espectrofotométricos permiten la evaluación de estos parámetros, asociándolos con condiciones de estrés en el desarrollo vegetal (Mei et al., 2020)

1.8.1. Ensayo de la captura de radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) .

El DPPH• es un compuesto químico estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de las moléculas. Se utiliza en la determinación de la capacidad antioxidante gracias a su capacidad de aceptar un átomo de hidrógeno. En la reacción final con el antioxidante este dona un átomo de hidrógeno que se puede observar con el cambio de color del medio de morado a amarillo. El color es monitoreado espectrofotométricamente y es usado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Río, 2013).

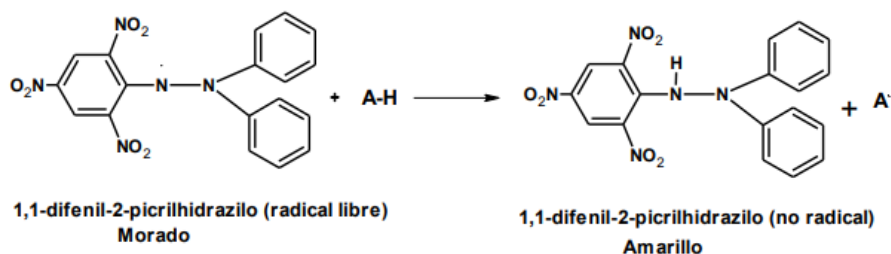


Figura 4. Estructura del DPPH• antes y después de la reacción con el antioxidante. Fuente (Río, 2013)

1.8.2. Captura del catión ABTS^{•+} (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico).

La prueba ABTS de actividad antioxidante tiene como finalidad medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018). El

fundamento de la técnica se basa en el uso del radical libre ABTS, es decir, se basa en la transferencia de un electrón al radical. El ensayo original de ABTS está basado en la generación del cromóforo $ABTS^{•+}$ en su forma estable, de color verde-azul, debido a la reacción de ABTS y el persulfato de potasio. Los antioxidantes adicionados en el punto final de la reacción lo reducen a $ABTS^{2-}$. El porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{•+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando un estándar, bajo las mismas condiciones del ensayo de la muestra problema (Medeiros de Oliveira & Lucchese, 2018; Ríó, 2013)

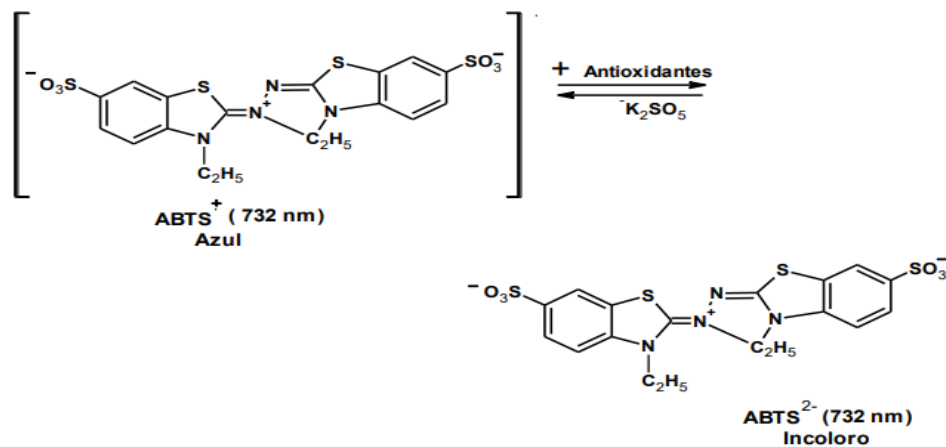


Figura 5. Estructura del $ABTS^{•+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante. Fuente (Ríó, 2013)

1.8.3. Cuantificación de fenoles totales por métodos espectrofotométricos.

El fundamento para la determinación del contenido fenólico total en una muestra se basa en una reacción de tipo colorimétrica cuyo producto final de reacción se mide espectroscópicamente y la cuantificación viene dada a través de la construcción de una curva de calibración de ácido gálico. El reactivo usado en el ensayo es el de Folin-Ciocalteu que consiste en una mezcla que contiene una mezcla de molibdato y tungstato sódico que se caracteriza por tener un color amarillo que al reaccionar con los fenoles de la muestra reduce el complejo fosfomolibdico/fosfotungstico en óxidos cromógenos de color azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el

molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones. El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina (Río, 2013; Córdova, 2020).

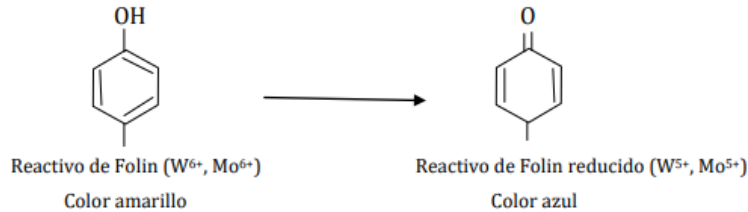


Figura 6. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu. **Fuente** (Díez de la Iglesia, 2020)

1.8.4. Actividad de la enzima catalasa (CAT).

La catalasa cataliza la descomposición de la molécula de H_2O_2 en una molécula de O_2 y dos moléculas de H_2O . La actividad de la catalasa puede medirse como la disminución del valor de absorbancia del H_2O_2 a 240 nm (Sunkar, 2010).

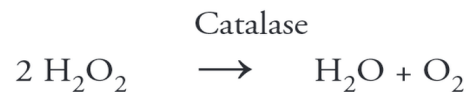


Figura 7. Reacción de degradación del peróxido de hidrogeno. **Fuente** (Díez de la Iglesia, 2020)

1.8.5. Actividad de la enzima peroxidasa (POX).

Las peroxidases específicas del ascorbato desempeñan un papel importante en la descomposición del H_2O_2 , descomponiéndolo en dos moléculas de H_2O en una molécula de O_2 . En la reacción, el ascorbato actúa como donante de electrones para la descomposición del H_2O_2 . La actividad enzimática se evalúa midiendo la velocidad de disminución de la absorbancia a 290 nm (Sunkar, 2010).

2. Metodología

2.1. Diseño y tipo de investigación.

La presente investigación se desarrolló aplicando un diseño analítico transversal

2.2. Recolección de muestras.

Se realizó la recolección de las partes aéreas de *E. secundum* a partir de especímenes que crecen in vivo en condiciones ambientales en los jardines del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Las muestras de cultivos in vitro de la especie en estudio, se obtuvo del Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Química Aplicada de la Universidad de Cuenca. Estas muestras provienen del medio modificado Phitamax™ Orchid Maintenance Medium (Sigma Aldrich, San Luis, Mo. USA), enriquecido con una mezcla acuosa de guineo (1:1), ácido 1-naftalenacético (ANA, 2,5 mg/L) y 6-bencilaminopurina (BAP, 2 mg/L); mantenidos en un cuarto de crecimiento a una temperatura de a 20-25 °C, con un fotoperiodo 16/8 suministrado por luz fluorescente blanca fría y una humedad relativa de 65-75%.

2.3. Obtención de extractos orgánicos a partir de biomasa vegetal in vitro e in vivo para la determinación de actividad antioxidante, concentración de fenoles totales.

El procedimiento se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por Yuzuak et al. (2018) con ciertas modificaciones. Las muestras recolectadas fueron lavadas para eliminar materiales extraños se sometieron a liofilización. El material liofilizado se trituró, haciendo pausas cada 5 segundos para evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Luego de registrar el peso del material triturado (0,3 g), se transfirieron tubos plásticos cónicos Falcon® de 50 mL, y se adicionaron 10 mL de metanol ($\geq 99,8$). Las muestras fueron homogeneizadas durante 60 segundos. Los tubos con los extractos se sonicaron durante 10 minutos. El material se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se separó el sobrenadante del residuo y se transfirió a tubos plásticos cónicos Falcon® de 50 mL, este proceso se repite una vez más con 10 mL de metanol ($\geq 99,8$). Los sobrenadantes se combinan y se evaporan a presión reducida en un rotavapor. Los residuos de solvente se eliminan tratando los extractos con corriente de nitrógeno. Con el fin de eliminar la clorofila, los extractos se resuspenden en 1 mL de cloroformo. Luego de centrifugar por cinco minutos a 6.000 rpm, se recupera la fase superior, el proceso se repite tres

veces. Los extractos de tejido vegetal in vivo e in vitro de la planta en estudio fueron nuevamente resuspendidos en 1 mL de metanol, centrifugados a 10.000 rpm durante cinco minutos y almacenados a 4 °C, para el desarrollo de los bioensayos.

2.4. Obtención de extractos acuosos para ensayos enzimáticos.

El proceso de extracción se llevó a cabo según el protocolo establecido por Elavarthi y Martin (2010) con ligeras modificaciones. Se registra el peso aproximado en gramos (1,6 g) del material vegetal in vivo e in vitro previamente lavado. En un mortero se coloca el material vegetal in vivo e in vitro por separado a los que se añade 7,2 mL buffer de extracción (tampón fosfato potásico 0,2 M con un pH de 7,8 más 0,1 mM de EDTA) y se trituran con la solución. Posteriormente, se colocaron los extractos vegetales en tubos Falcon® y se procede a centrifugar a 4 °C a 4000 rpm durante 20 minutos. Del centrifugado se recuperan los sobrenadantes en tubos Falcon® nuevos, se procede a resuspender los tubos que contienen los precipitados con 0,8 mL del buffer de extracción y se centrifuga bajo las mismas condiciones mencionadas previamente. Finalmente, los sobrenadantes se mezclan y se almacenan a 4 °C hasta el momento de las mediciones.

2.5. Ensayos espectrofotométricos de captura de radicales libres.

2.5.1. Ensayo de captura del radical libre ABTS^{•+} (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).

Se utilizó el radical libre estable ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico-ácido) para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos, según el protocolo de Mingle y Newsome (2020) con pocas modificaciones. Para ello, se preparó una solución de trabajo usando una mezcla de 7 mL de solución ABTS 0,7 mM (disolviendo una pastilla de ABTS que pesa 10 mg en 14 mL de buffer PBS) más 7 mL de una solución acuosa 2,45 Mm de persulfato de potasio. Se mezclaron las dos soluciones y se dejaron en reposo durante 30 minutos en completa oscuridad.

Se preparó una placa de microtitulación de 96 pozos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de orquídeas. La organización de la placa se presenta en la **Fig.8**:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	N	P
B	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	N	P
C	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	N	P
D												
E	E1	E1	E1									
F	E2	E2	E2									
G												
H												

	Columnas 1 – 10: Microdilución de ácido ascórbico (µg/mL)
	Control negativo buffer PBS (N)
	Control positivo ABTS (P)
	Extracto de <i>E. secundum</i> in vivo (E1)
	Extracto de <i>E. secundum</i> in vitro (E2)

Figura 8. Organización de la microplaca para desarrollar el ensayo de captura ABTS.

Se construyó una curva de calibración de ácido ascórbico, cuya concentración oscila entre 1.000 y 0,9 µg/mL. En los pocillos destinados a las muestras se colocó una alícuota de 50 µL de los extractos orgánicos in vivo e in vitro y se diluyó con 50 µL de tampón PBS y 100 µL de reactivo de trabajo en condiciones de oscuridad durante 15 minutos. La absorbancia se leyó a 734 nm, en un espectrofotómetro de microplaca Epoch® (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Los pocillos de la curva de calibración se trataron en las mismas condiciones que los extractos y las mediciones se realizaron por triplicado. Se procesaron los datos obtenidos mediante el uso de la ecuación de la recta, donde los valores obtenidos representan el potencial antioxidante expresado en miligramos de equivalentes de ácido ascórbico (mgEqAA) por mililitro extracto (mgEqAA/mL).

2.5.2. Ensayo de captura del radical libre DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).

La prueba se realizó según lo establecido por Medeiros de Oliveira & Lucchese (2018) con algunas modificaciones. Para ello, se preparó una solución metanólica de DPPH y se preparó una placa de microtitulación de 96 pozos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de orquídeas. La organización de la placa se presenta en la **Fig.9:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	N	P
B	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	N	P
C	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	N	P
D												
E	E1	E1	E1									
F	E2	E2	E2									
G												
H												

	Columnas 1 – 10: Microdilución de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$)
	Control negativo metanol (N)
	Control positivo DPPH (P)
	Extracto de <i>E. secundum</i> in vivo (E1)
	Extracto de <i>E. secundum</i> in vitro (E2)

Figura 9. Organización de la microplaca para desarrollar el ensayo de captura DPPH.

En los pocillos destinados a las muestras se colocó 100 μL de extracto (dilución 1:10) de las muestras in vitro e in vivo y 100 μL del reactivo DPPH. Se preparó el espectrofotómetro y se colocó la microplaca en el espectrofotómetro de microplaca Epoch® (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos), ajustando la longitud de onda a 515 nm para medir la absorbancia. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los pocillos de la curva de calibración se trataron en las mismas condiciones que los extractos. Los resultados se obtuvieron mediante la construcción de una curva de calibración a partir del patrón de ácido ascórbico a diferentes concentraciones (1.000 y 0,9 $\mu\text{g/mL}$). Se procesaron los datos obtenidos mediante el uso de la ecuación de la recta, donde los valores obtenidos representan el potencial antioxidante expresado en miligramos de equivalentes de ácido ascórbico (mgEqAA) por mililitro extracto (mgEqAA/mL).

2.6. Cuantificación de fenoles totales por métodos espectrofotométricos.

El contenido fenólico total de los extractos in vitro e in vivo se determinó siguiendo el protocolo de Stankovic et al. (2011) con algunas modificaciones. En el caso de los extractos vegetales como presentaron una coloración verde intensa, se realizó una dilución 1:20. En tubos Eppendorf de 1,5 mL se colocó 25 μL de cada una de las soluciones patrón de ácido gálico, 25 μL del metanol (blanco) y 25 μL de la solución diluida de las muestras problema. A estos 25 μL se le añaden 25

μL de reactivo Folin-Ciocalteu y se deja reposar tres minutos en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 500 μL de solución de carbonato sódico (7,5%) a las mezclas de reacción. A continuación, se añadió agua destilada hasta completar el volumen a 900 μL . La solución final se dejó en reposo durante 1 hora en completa oscuridad. Finalmente, transcurrido ese tiempo se tomó una alícuota de 300 μL de cada una de las soluciones de extractos vegetales para colocar en la microplaca. Se preparó la placa de microtitulación de 96 pozos para evaluar la concentración de fenoles totales de los extractos orgánicos de orquídeas. La organización de la placa se presenta en la **Fig.10**:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E2	N	400	200	150	100	50				
B	E1	E2	N									
C	E1	E2	N									
D												
E												
F												
G												
H												

	Columnas 3 – 8: Diluciones seriadas (ppm)
	Control negativo metanol (N)
	Extracto de <i>E. secundum</i> in vivo (E1)
	Extracto de <i>E. secundum</i> in vitro (E2)

Figura 10. Organización de la microplaca para desarrollar el ensayo de concentración de fenoles totales.

2.7. Actividad enzimática de extractos acuosos vegetales.

2.7.1. Inhibición de la enzima peroxidasa (POX).

La actividad de la peroxidasa (POX) se determinó basándose en los protocolos establecidos por Nakano y Asada (1981) y Flocco y Giuletti (2007) que fueron modificados en algunos puntos. Se preparó una mezcla de ensayo de 3 mL añadiendo 800 μL de ascorbato sódico 0,5 mM, 1,5 mL de tampón fosfato potásico 50 mM (pH=7,0), 100 μL del extracto fresco, 100 μL de H_2O_2 0,1 mM y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La absorbancia se midió cada 30 segundos durante 3 minutos a una longitud de onda de 290 nm usando un espectrofotómetro (Ciba Corning®). Tomar

en consideración que la reacción inicia con la adición del H₂O₂ por lo que este se añadió en la fase final, una vez colocado la medición fue inmediata. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como unidad por gramo de proteína (U/g), donde una unidad de actividad equivale a 1 mM de H₂O₂ degradado por minuto:

$$U/mL = \left(\frac{V_f}{V_i} \times A \times 1 \right) \times \left(\frac{\Delta \text{Absorbancia}}{\text{Minuto}} \right) \quad (\text{Ecuación 1})$$

V_f: volumen final en la mezcla de reacción.

V_i: volumen de la muestra utilizado en la mezcla de reacción.

A: coeficiente de extinción.

1: recorrido de la luz (1.0 cm).

Δ Absorbancia/Minuto: reducción de la absorbancia por minuto

Los resultados se normalizarán en unidades por gramo de tejidos vegetales:

$$U/g = \left(\frac{U}{mL} \right) \times \left(\frac{V_e}{FW_e} \right) \quad (\text{Ecuación 2})$$

V_e: volumen del tampón utilizado para preparar el extracto enzimático.

FW_e: peso fresco (gramos) de los tejidos utilizados para preparar el extracto enzimático.

2.7.2. Inhibición de la enzima catalasa (CAT).

La actividad catalasa (CAT) se estableció basándose en los protocolos de Aebi (1984) y Flocco y Giuletti (2007) con ligeras modificaciones. Se preparó una mezcla de ensayo de 3 mL añadiendo 50 μL del extracto fresco, 500 μL de H₂O₂ 7,5 mM, 1,5 mL de tampón fosfato potásico 50 mM (pH=7,0) y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La absorbancia se midió cada 30 segundos durante 3 minutos a una longitud de onda de 240 nm usando un espectrofotómetro (Ciba Corning®). Tomar en consideración que la reacción inicia con la adición del H₂O₂ por lo que este se añadió en la fase final, una vez colocado la medición fue inmediata. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como unidad por gramo de proteína (U/g), donde una unidad de actividad equivale a 1 mM de H₂O₂ degradado por minuto y se calculó mediante la ecuación 1 y 2.

2.8. Análisis estadístico de datos.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se tabularon usando las medidas estadísticas descriptivas (media, desviación estándar y error estándar) que permitió estimar la variabilidad de las mediciones. Para evaluar la relación lineal entre variables se calculó el estadístico R^2 y se efectuó la prueba de t student, que establecen diferencias significativas entre las orquídeas cultivadas in vivo e in vitro mediante estas pruebas paramétricas.

3. Resultados

3.1. Captura de radicales libres por extractos orgánicos de *E. secundum*, cultivados en condiciones in vivo e in vitro.

La capacidad antioxidante total se determinó por medio de los métodos colorimétricos estandarizados DPPH y ABTS en *E. secundum*. Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante tanto en muestras in vivo como in vitro se resumen en la tabla a continuación:

	<i>E. secundum</i> in vivo	<i>E. secundum</i> in vitro	Valor p
Captura de ABTS (mg. Eq Ác.Asc/mL)	0,71* ± 0,13	0,70* ± 0,03	p > 0,05
Captura de DPPH (mg. Eq Ác.Asc/mL)	0,34* ± 0,003	0,30* ± 0,02	p < 0,05

Tabla 1. Resultados de ensayos espectrofotométricos de captura de radicales libres ABTS y DPPH. (*: promedio de tres repeticiones. Valor p obtenido de prueba t de Student, al 95% de confianza).

3.2. Cuantificación de fenoles totales por métodos espectrofotométricos.

Se determinó también el contenido de fenoles totales en muestra de *E. secundum* usando el método Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos tanto en muestra in vivo como in vitro se resumen en la tabla a continuación:

	<i>E. secundum</i> in vivo	<i>E. secundum</i> in vitro	Valor p
Contenido fenólico total (mg Eq Ác. gal/mL extracto)	1,02* ± 0,05	0,68* ± 0,05	p < 0,05

Tabla 2. Resultados de ensayos espectrofotométricos de cuantificación de fenoles totales. (*: promedio de tres repeticiones. Valor p obtenido de prueba t de Student, al 95% de confianza)

3.3. Actividad enzimática de extractos acuosos vegetales.

Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante enzimática CAT y POX tanto en muestra in vivo como in vitro se resumen en la tabla a continuación:

	<i>E. secundum</i> in vivo	<i>E. secundum</i> in vitro	Valor p
Catalasa (U/g)	1.070,61* \pm 356,87	5.094,14* \pm 1.436,35	p < 0,05
Peroxidasa (U/g)	333,07* \pm 72,12	265,37* \pm 112,18	p > 0,05

Tabla 3. Resultados de ensayos espectrofotométricos de actividad enzimática catalasa y peroxidasa. (*: promedio de tres repeticiones. Valor p obtenido de prueba t de Student, al 95% de confianza)

4. Discusión

Según la literatura revisada, la mayoría de estudios realizados en orquídeas evalúan su potencial como productoras de metabolitos bioactivos. Actualmente, son pocos los estudios sobre las respuestas de las orquídeas frente a variaciones en la temperatura que conducen al estrés e influyen en el crecimiento, desarrollo y el mantenimiento de la integridad de los tejidos. Hasta nuestro mejor conocimiento, no se han reportado estudios en *Epidendrum secundum*, como organismo modelo para evaluar estrategias de defensa antioxidante ante estrés oxidativo. (Ali et al., 2005; Minh et al., 2016).

La metodología desarrollada en este estudio se enfocó en determinar la influencia del medio en los mecanismos de defensa antioxidante en orquídeas. Los resultados obtenidos de actividad antioxidante mediante el ensayo de captura de radicales libres ABTS y DPPH, revelan una mayor actividad antioxidante en las muestras in vivo, es decir las que se han desarrollado ambientalmente, esto como consecuencia directa de la suma de las acciones llevadas a cabo por los diferentes factores tanto bióticos como abióticos que influyen en el desarrollo normal de *E. secundum* que corrobora los resultados de los ensayos llevados a cabo por Ali et al. (2005) en los que concluye que la temperatura es uno de los factores más relevantes que influyen en el crecimiento vegetal en el entorno natural e influyen directamente en la calidad de las flores en función de las fluctuaciones de temperatura durante el día y la noche.

Los ensayos son concluyentes y establecen una mayor concentración antioxidante en las orquídeas in vivo que las que han crecido a nivel de laboratorio, lo que demuestra confirmar nuestra hipótesis al establecer que las fluctuaciones ambientales influyen de manera directa en la producción de componentes de defensa e incluso de acuerdo a los datos proporcionados por Ali et al. (2005), Mencias & Salazar (2018) y F. Mencias et al. (2021) la actividad antioxidante está directamente relacionada con el tipo de tejido (una mayor actividad antioxidante se observa en las hojas, ya que en estas se encuentran la mayor cantidad de los sistemas antioxidantes que responden a los cambios de temperatura) y la especie que se ensaya.

Los compuestos fenólicos son una de las principales clases químicas de metabolitos secundarios de las plantas. Desempeñan un papel importante en la defensa de las plantas contra patógenos, enfermedades, parásitos y depredadores. Participan en una serie de mecanismos fisiológicos como la actividad antioxidante. También participan en la estabilización de la peroxidación lipídica. La cantidad de compuestos fenólicos producidos por una planta depende de varios

factores, como la temperatura, la luz ultravioleta, la nutrición disponible para la planta y factores genéticos (Minh et al., 2016). De acuerdo a los datos obtenidos, los resultados de las muestras in vivo presentaron una mayor concentración de fenoles que las muestras in vitro, cuya variación en la concentración fue significativa.

El resultado de concentración de fenoles presenta una correlación significativa con la actividad antioxidante mucho mayor en las muestras in vivo. En ensayos similares llevados a cabo por Ampofo et al. (2020), concluyeron que, en situaciones de estrés térmico, uno de los mecanismos de defensa de las plantas consiste en activar la vía fenilpropanoide, la principal responsable de la biosíntesis de compuestos fenólicos de defensa. En resumen, los tratamientos térmicos elevan los niveles de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en comparación con plantas desarrolladas temperaturas de control.

Dado que el objetivo del presente estudio era caracterizar las respuestas de los sistemas antioxidantes tras la exposición a variaciones de temperatura, las enzimas antioxidantes parecen tener un papel relevante en la reducción del daño por temperatura, entre las que se encuentran la catalasa y peroxidasa principalmente en cultivares tolerantes. Los resultados obtenidos en el ensayo para peroxidasa arrojan datos similares entre las dos muestras obtenidas. Sin embargo; catalasa muestra datos completamente diferentes a los esperados, donde la concentración enzimática in vitro es mucho mayor en las plantas desarrolladas in vitro. La observación de un cambio en las concentraciones de componentes antioxidantes enzimáticos, puede ser explicado por la alta tasa de tolerancia y variaciones genéticas generadas durante el desarrollo in vitro e incluso el mantenimiento de las plantas en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura.

Anjum et al., (2016) establece que el sistema enzimático se activa a determinadas temperaturas, ya que para un tipo específico de planta la temperatura óptima de desarrollo puede ser 35 °C, mientras que para otro puede ser 15 °C. Argumentándose que estas temperaturas óptimas pueden parecerse mucho a la temperatura en la que crecen las plantas. Ampofo et al. (2020) confirmó elevadas actividades de las enzimas CAT, especialmente con el tratamiento térmico a 30 °C, pero se inactivó notablemente en plántulas estresadas a 40 °C de diferentes cultivares (Dash & Mohanty, 2002).

En su investigación, Soengas et al., (2018), concluyeron que la actividad de estas enzimas es significativamente mayor en condiciones de frío y calor en plantas sometidas a dos tipos de temperatura extrema en comparación con cultivares desarrollados a temperatura control. La actividad de estas enzimas también se ha asociado a la resistencia al estrés térmico, aumento su actividad enzimática. El papel integrado de diferentes enzimas antioxidantes como CAT, POX ayuda en la conversión de ROS y la recuperación de metabolitos redox. La alta actividad de CAT y POX tiene un efecto colateral tanto en el estrés abiótico como biótico, es decir, incrementa la tasa de eliminación de H_2O_2 y aumenta la tolerancia en condiciones variantes de temperatura (Rai et al., 2015; Boo et al., 2011).

5. Conclusiones

El desarrollo del presente trabajo permite concluir que los niveles de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y componentes de defensa enzimáticos están directamente relacionados con el tipo de tejido que se analiza y su origen. Las variaciones en las concentraciones están directamente relacionadas a los factores externos que afectan el desarrollo de la planta. Así tenemos que a nivel de laboratorio influye entre otros factores el número de replantes, los antisépticos usados, la temperatura; en relación a los factores que influyen en el desarrollo ambiental tenemos factores bióticos y abióticos ya mencionados.

La asociación de las enzimas antioxidantes (SOD, POX) sistemas antioxidantes y compuestos fenólicos permiten evitar los daños oxidativos sobre los componentes intracelulares de la planta a un nivel muy bajo. Los resultados obtenidos demuestran que el medio influye significativamente en la activación de sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Esto permite entender cómo se adaptan frente a condiciones de cultivo a nivel de laboratorio e incluso cuando las condiciones ambientales son desfavorables, activando un sistema o desactivando otro para poder sobrevivir y evolucionar, que es una característica propia de las orquídeas.

6. Recomendaciones

Las estrategias de conservación suelen conducir a de modificación de ciertos aspectos durante el desarrollo de las orquídeas que debe considerarse un tema de importancia nacional, el gobierno junto con la participación de diversas entidades gubernamentales como no gubernamentales e incluso la colaboración internacional deben trabajar en conjunto con la finalidad de establecer dichas estrategias y evaluar su viabilidad. Dentro de este marco se busca la conservación in situ y ex situ, de la cuales la más idónea es la ex situ ya que los especímenes vegetales biológicos obtenidos en su ambiente natural conservan al máximo sus características. La protección del hábitat es un de las estrategias más importancia para las orquídeas, la creación de ares protegidas constituye un elemento central en el proceso de conservación vegetal para mantener y conservar la biodiversidad. Sin embargo, la desventaja que presenta esta estrategia es la baja regulación y control de la ley lo que aumenta la tasa de recolección ilegal en muchos lugares.

La conservación ex situ tiene como finalidad la conservación de especies que no se pueden mantener en sus hábitats naturales, generalmente estos pueden funcionar como un complemento a las técnicas in situ y que actúan como un “póliza de seguro” que impiden la extinción completa de orquídeas o permiten la recuperación de especies amenazadas. Por lo tanto, el perfeccionamiento de técnicas de conservación para la recuperación a largo es una necesidad inminente e imperante. Es importante mencionar que la reproducción a nivel de laboratorio es muy difícil ya que es no es posible replicar por completo las condiciones ambientales, pero el control de las variables implicadas tanto físicas como químicas permite el desarrolla y mantenimiento de las especies vegetales. Generalmente, se establecen diferentes estudios sobre la influencia del medio in vitro sobre el desarrollo y los beneficios de ciertos elicitores químicos que desencadenan la respuesta antioxidante, así como el beneficio o la desventaja de la actividad antioxidante sobre la tasa de supervivencia de las plantas, en este caso de las orquídeas. Lo que la convierte en una alternativa sostenible que permitirá mantener los especímenes vegetales

Se recomienda realizar ensayos experimentales, para determinar la influencia de la temperatura en la activación o inactivación de los sistemas de defensa.

Referencias

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ahmad, P., Azooz, M. M., & Prasad, M. N., V. (2012). *Ecophysiology and Responses of Plants Under Salt Stress* (2013 ed.). Springer.
- Ali, M. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2005). Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in Phalaenopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.007>
- Ampofo, J., Ngadi, M., & Ramaswamy, H. S. (2020). The Impact of Temperature Treatments on Elicitation of the Phenylpropanoid Pathway, Phenolic Accumulations and Antioxidative Capacities of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Sprouts. *Food and Bioprocess Technology*, 13(9), 1544-1555. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02496-9>
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., Vasudhevan, P., Sofo, A., Khan, N. A., Misra, A. N., Lukatkin, A. S., Singh, H. P., Pereira, E., & Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002-19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- Azevedo, H., Glória Pinto, C. G., & Santos, C. (2005). Cadmium Effects in Sunflower: Membrane Permeability and Changes in Catalase and Peroxidase Activity in Leaves and Calluses. *Journal of Plant Nutrition*, 28(12), 2233-2241. <https://doi.org/10.1080/01904160500324816>
- Boo, H. O., Heo, B. G., Gorinstein, S., & Chon, S. U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science*, 181(4), 479-484. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.013>
- Bose, B., Kumaria, S., Choudhury, H., & Tandon, P. (2017). Insights into nuclear DNA content, hydrogen peroxide and antioxidative enzyme activities during transverse thin cell layer organogenesis and ex vitro acclimatization of *Malaxis wallichii*, a threatened medicinal orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4), 955-968. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0474-3>
- Briceño Carrasquel, J., & Sailema Ortiz, M. (2019, 31 julio). *Extracción simultánea de polifenoles totales y flavonoides totales en hojas de Fragaria spp.* Repositorio Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/29997>

- Buyun, L., Ivannikov, R., Batsmanova, L., Taran, N., Kovalska, L., Gumenko, I., & Maryniuk, M. (2021). Structural Adaptation and Antioxidant Response of *Guarianthe bowringiana* (O'Brien) Dressler & W. E. Higgins (Orchidaceae Juss.) Seedlings During Ex Vitro Acclimatization. *Acta Agrobotanica*, 74. <https://doi.org/10.5586/aa.7422>
- Cacique, A. P., Barbosa, R. S., Pinho, G. P. D., & Silvério, F. O. (2020). Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia*, 44. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420>
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 suppl 1), 1011-1019. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600016>
- Chaves-Barrantes, N. F., & Gutiérrez-Soto, M. V. (2016). Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 237. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21903>
- Córdova, M., & González, I. (2020, 14 julio). *Repositorio Yachay Tech: Preliminary phytochemical characterization of extracts of the orchid Epidendrum coryophorum*. <https://repositorio.yachaytech.edu.ec/handle/123456789/206>
- Córdova, M. V. (2020, 14 julio). *Preliminary phytochemical characterization of extracts of the orchid Epidendrum coryophorum*. Repositorio Yachay Tech. <https://repositorio.yachaytech.edu.ec/handle/123456789/206>
- Dash, S., & Mohanty, N. (2002). Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: Growth temperature-dependent differential modulation of photosystem 1 and 2 activity, and foliar antioxidant defense capacity. *Journal of Plant Physiology*, 159(1), 49-59. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00594>
- Díez de la Iglesia, L. (2020, 20 octubre). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en olivas*. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/62677/>
- Elavarthi, S., & Martin, B. (2010). Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants. *Methods in Molecular Biology*, 273-280. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_16
- Endara, L., Hirtz, A., Jost, L., Reynolds, A., Neubig, K., Hagsater, E., Phillip, C., Simpson, N., & Cornejo, X. (2017). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Floraweb. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500330>

- Epidendrum secundum* -. (2018, 28 febrero). La energía de las flores.
<https://laenergiadelasflores.wordpress.com/tag/epidendrum-secundum/>
- Fernandes, F. M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Wilcock, C. C., & de Carvalho, M. A. A. P. (2007). Volatiles of the Inflorescences of the Madeiran Orchids, *Goodyera macrophylla* Lowe and *Gennaria diphylla* (Link) Parl. and Their Role in Pollination. *Natural Product Communications*, 2(4), 1934578X0700200. <https://doi.org/10.1177/1934578x0700200414>
- Flocco, C., & Giulietti, A. (2007). *Métodos en Biotecnología: Cultivos de raíces peludas in vitro como herramienta para la investigación en fitorremediación*. (Vol. 23). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-098-0_14
- Freuler, M. J. (2008). *Orquídeas*. Albatros/Argentina. https://books.google.com.ec/books?id=SjFbL4qd9-MC&dq=orquideas+caracter%C3%ADsticas&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Georgieva, K., Mihailova, G., Gigova, L., Dagnon, S., Simova-Stoilova, L., & Velitchkova, M. (2021). The role of antioxidant defense in freezing tolerance of resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(5), 1119-1133. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00998-0>
- Grogan, G. (2012). 7.14 Oxidation: Asymmetric Enzymatic Sulfoxidation. *Comprehensive Chirality*, 295-328. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-095167-6.00718-7>
- Gualpa, C. (2013, 16 julio). *Inventario de las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico del ecozoológico san martín de la ciudad de baños durante el periodo de noviembre 2008 a febrero 2009*. Repositorio Universidad Técnica de Ambato. <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/4467>
- Gutiérrez, D., Navarrete, G., & Espín, C. (2014). Orquídeas de la Amazonía Ecuatoriana: maravillas escondidas en las montañas Andino - Amazónicas. *Socio ambiental de la Amazonía Ecuatoriana*, 11. <https://docplayer.es/148346467-Orquideas-de-la-amazonia-ecuatoriana-maravillas-escondidas-en-las-montanas-andino-amazonicas.html>
- Haida, Z., & Hakiman, M. (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science & Nutrition*, 7(5), 1555-1563. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Zulfikar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants

- under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2011). Plant Response and Tolerance to Abiotic Oxidative Stress: Antioxidant Defense Is a Key Factor. *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*, 261-315. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0_8
- Herrera, M. M. E. (2021, 23 junio). *Evaluación del ácido salicílico en la aclimatación ex vitro de microplantas de Laelia autumnalis (Lex.) Lind., Epidendrum sp. y Encyclia sp.* <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110584>
- Hussain, S., Rao, M. J., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, N., & Ahmad, S. (2019). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under Drought Conditions. *Plant Abiotic Stress Tolerance*, 207-219. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9
- Jaleel, C. A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 427-436. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0275-6>
- Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2004). Antioxidant activities of flavidin in different in vitro model systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(19), 5141-5146. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.028>
- Jimenez, M. (2014). *Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/268632113_Orquideas_del_Ecuador-Numero_de_especies_endemismo_especies_amenazadas_y_su_manejo_adeecuado
- Julsrigival, J., Julsrigival, S., & Chansakaow, S. (2020). The Diurnal and Nocturnal Floral Scent of *Dracaena fragrans* (L.) Ker Gawl. in Thailand. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 19(1), 52-60. <https://doi.org/10.12982/cmujns.2020.0004>
- Medeiros de Oliveira, I., & Lucchese, A. M. (2018, 30 julio). *TEDE: Composição química e atividade biológica de Vanilla palmarum e Lippia alba*. <http://tede2.uefs.br:8080/handle/tede/851>
- Mei, Y., Sun, H., Du, G., Wang, X., & Lyu, D. (2020). Exogenous chlorogenic acid alleviates oxidative stress in apple leaves by enhancing antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*, 274, 109676. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109676>

- Mencias, F., Salazar, T., & Cerna, M. (2021). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Epidendrum nocturnum*. *Bionatura*, 6(1), 1486-1489. <https://doi.org/10.21931/rb/2021.06.01.8>
- Mencias, H. F., & Salazar, T. (2018, 10 agosto). *Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros epidendrum, oncidium y caucea*. Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15932>
- Mingle, C. E., & Newsome, A. L. (2020). An amended potassium persulfate ABTS antioxidant assay used for medicinal plant extracts revealed variable antioxidant capacity based upon plant extraction process. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.204065>
- Minh, T., Khang, D., Tuyen, P., Minh, L., Anh, L., Quan, N., Ha, P., Quan, N., Toan, N., Elzaawely, A., & Xuan, T. (2016). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Phalaenopsis Orchid Hybrids. *Antioxidants*, 5(3), 31. <https://doi.org/10.3390/antiox5030031>
- Ministerio del ambiente. (s. f.). *Ecuador, el primer "País de las Orquídeas" del mundo*. Gobierno de la República del Ecuador. Recuperado 2 de enero de 2023, de <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-el-primer-pais-de-las-orquideas-del-mundo/>
- Mites Cadena, M., & Oña, E. P. (2018). Diversidad de Orquídeas de los Bosques Deciduo y Siempre Verde Estacional en Manabí, Ecuador. *Revista Científica Hallazgos* 21, 3(2), 154-168. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7148200.pdf>
- Moattar, F. S., Khayatzadeh, R. S., Yaghmaee, P., & Giahi, M. (2017). Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidants of *Calamintha officinalis* Moench Extracts. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3(4), 489-494. http://www.biotechrep.ir/article_69239_43d3ef649b9660e9393b708a98acfd07.pdf
- Molina Sandoval, L. (2020, 21 agosto). *"Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de cinco especies de orquídeas de los géneros Maxillaria, Catasetum y Epidendrum, presentes en el Ecuador"*. Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18989>
- Murillo-Talavera, M., Pedraza Santos, M., Gutiérrez- Rangel, N., Rodríguez Mendoza, M., Lobit, P., & Martínez Palacios, A. (2016). *Calidad de la luz led y desarrollo «in vitro» de «Oncidium tigrinum» y «Laelia autumnalis» (orchidaceae)*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6450036>

- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Olivares, J. (2021, 23 junio). *Evaluación del ácido salicílico en la aclimatación ex vitro de microplantas de Laelia autumnalis (Lex.) Lind., Epidendrum sp. y Encyclia sp.* UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110584>
- Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7(10), 448-467. <https://doi.org/10.5897/ajps2013.1031>
- Peñaloza H., E. (2018, 30 octubre). *Estrés oxidativo en plantas; una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico*. Phloem. <https://phloem.cl/estres-oxidativo-en-plantas-una-consecuencia-inevitable-del-metabolismo-aerobico/>
- Perez, E. M. (2010). *OPUS Würzburg | Poplar responses to biotic and abiotic stress*. <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/year/2010/docId/3809>
- Pérez, L. A. (2016, 1 julio). *Extracción, cuantificación y actividad antiinflamatoria de compuestos fenólicos de Laelia furfuracea (Orchidaceae)*. Repositorio Dspace. http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/handle/LITER_CIIDIROAX/267
- Poobathy, R., Sinniah, U. R., Xavier, R., & Subramaniam, S. (2013). Catalase and Superoxide Dismutase Activities and the Total Protein Content of Protocorm-Like Bodies of Dendrobium Sonia-28 Subjected to Vitrification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(5), 1066-1079. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0241-z>
- Pooja, & Munjal, R. (2019). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under High Temperature. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, 337-352. <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch14>
- Rai, N., Rai, K. K., Tiwari, G., & Singh, P. K. (2015). Changes in free radical generation, metabolites and antioxidant defense machinery in hyacinth bean (*Lablab purpureus*. L) in response to high temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(3). <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1791-1>
- Repilado Álvarez, A. (2016, febrero). *ANTIOXIDANTES*. Universidad Complutense de Madrid. https://biblioteca.semisud.org/opac_css/index.php?lvl=notice_display

- Río, T. J. del. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas +*). Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in *Brassica oleracea*. *ACS Omega*, 3(5), 5237-5243. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00242>
- Sofy, A. R., Dawoud, R. A., Sofy, M. R., Mohamed, H. I., Hmed, A. A., & El-Dougdoug, N. K. (2020). Improving Regulation of Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants and Stress-Related Gene Stimulation in Cucumber mosaic cucumovirus-Infected Cucumber Plants Treated with Glycine Betaine, Chitosan and Combination. *Molecules*, 25(10), 2341. <https://doi.org/10.3390/molecules25102341>
- Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., & Solujic, S. (2011). Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 2222-2227. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0020>
- Sunkar, R. (2010). *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*: 639. Humana Press.
- Thangavelu, M., & Shenbagam, M. (2017). Vegetative anatomical adaptations of *Epidendrum radicans* (Epidendroideae, Orchidaceae) to epiphytic conditions of growth. *Modern Phytomorphology*, 11, 2227-9555. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1078523>
- Thapa, B. B., Thakuri, L. S., Joshi, P. R., Chand, K., Rajbahak, S., Sah, A. K., Shrestha, R., Paudel, M. R., Park, S. Y., & Pant, B. (2020). Ex-situ conservation and cytotoxic activity assessment of native medicinal orchid: *Coelogyne stricta*. *Journal of Plant Biotechnology*, 47(4), 330-336. <https://doi.org/10.5010/jpb.2020.47.4.330>
- Venturieri, G. A., & Arbiato, E. A. M. D. (2011). Ex-vitro establishment of *Phalaenopsis amabilis* seedlings in different substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3). <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.3950>
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., & Cai, Y. (2019). The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *BioMed Research International*, 2019, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2019/9732325>
- Yuzuak, S., Ballington, J., & Xie, D. Y. (2018). HPLC-qTOF-MS/MS-Based Profiling of Flavan-3-ols and Dimeric Proanthocyanidins in Berries of Two Muscadine Grape Hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66. *Metabolites*, 8(4), 57. <https://doi.org/10.3390/metabo8040057>

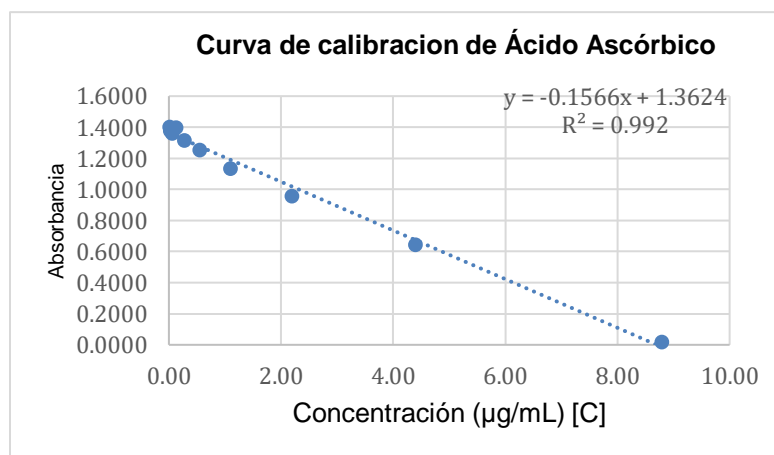
Anexos

Anexo A

Tabla A1. Absorbancias de las diferentes concentraciones de Ácido ascórbico para la construcción de la curva de calibración, ABTS.

	Patrón (1/2)	D1 (1/4)	D2 (1/6)	D3 (1/8)	D4 (1/10)	D5 (1/12)	D6 (1/14)	D7 (1/16)	D8 (1/18)	D9 (1/20)	MetOH (Blanco)	ABTS (Control)
A	0,049	0,689	0,996	1,139	1,294	1,333	1,395	1,377	1,423	1,438	0,038	3,113
B	0,069	0,697	0,998	1,186	1,291	1,366	1,409	1,403	1,417	1,441	0,037	2,922
C	0,052	0,665	0,998	1,192	1,295	1,36	1,503	1,412	1,407	1,437	0,037	3,767
PROM	0,0567	0,6837	0,9973	1,1723	1,2933	1,3530	1,4357	1,3973	1,4157	1,4387	0,0373	3,2673

Anexo A2. Curva de calibración para la determinación de la captura de radicales libres ABTS.



Anexo A3. Capacidad antioxidante ABTS y estadística descriptiva de las muestras in vitro vs. in vivo.

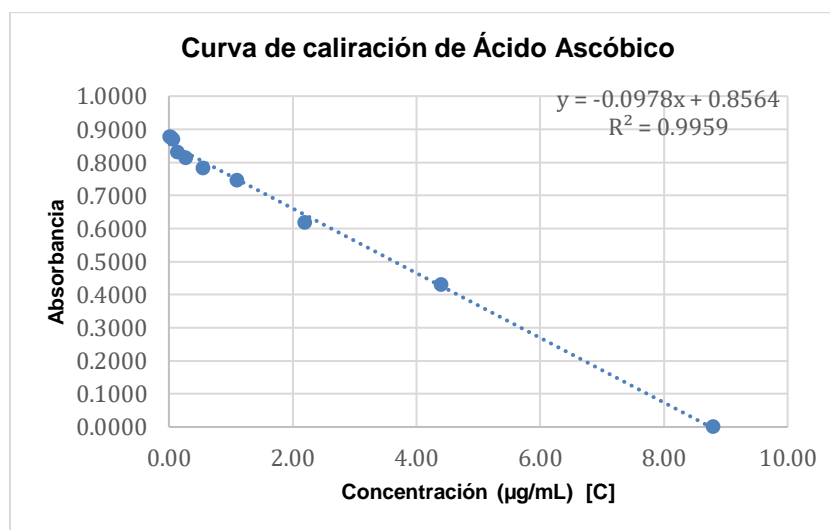
	mg. Eq Ác.Asc/mL	
	In vivo	In vitro
	0,62	0,74
	0,85	0,77
	0,86	0,81
Promedio	0,78	0,77
Desviación estándar	0,14	0,03
Error estándar	0,06	0,01

Anexo B

Anexo B1. Absorbancias de las diferentes concentraciones de Ácido ascórbico para la construcción de la curva de calibración, DPPH.

	Patrón (1/2)	D1 (1/4)	D2 (1/6)	D3 (1/8)	D4 (1/10)	D5 (1/12)	D6 (1/14)	D7 (1/16)	D8 (1/18)	D9 (1/20)	MetOH (Blanco)	ABTS (Control)
A	0,041	0,481	0,667	0,761	0,819	0,831	0,899	0,898	0,919	0,935	0,038	1,565
B	0,041	0,448	0,647	0,802	0,831	0,856	0,848	0,907	0,907	0,898	0,039	1,674
C	0,037	0,481	0,654	0,789	0,812	0,871	0,862	0,919	0,915	0,916	0,039	1,607
PROM	0,0397	0,4700	0,6560	0,7840	0,8207	0,8527	0,8697	0,9080	0,9137	0,9163	0,0387	1,6153

Anexo B2. Curva de calibración para la determinación de la captura de radicales libres DPPH.



Anexo B3. Capacidad antioxidante DPPH y estadística descriptiva de las muestras in vitro vs. in vivo.

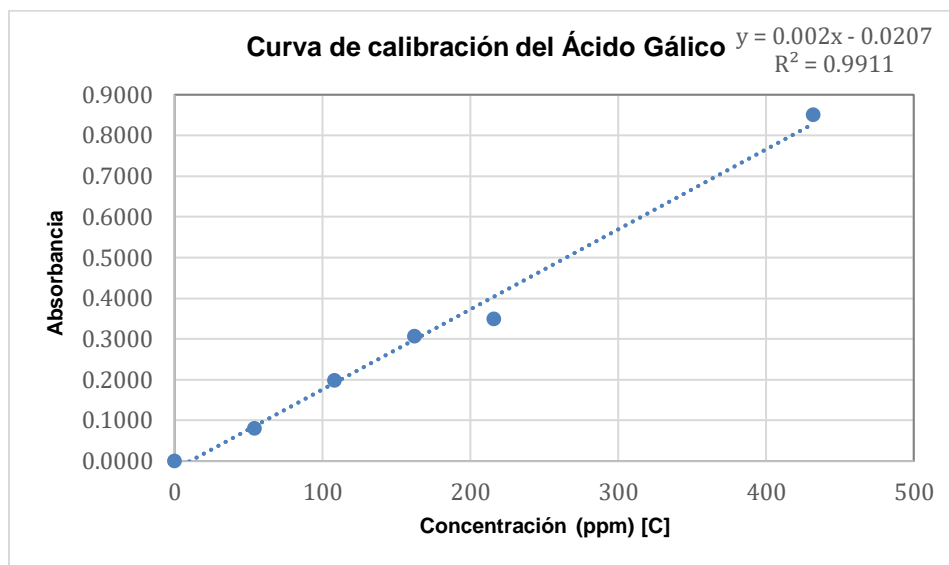
	mg. Eq Ác.Asc/mL	
	In vivo	In vitro
	0,35	0,24
	0,34	0,29
	0,34	0,30
Promedio	0,34	0,28
Desviación estándar	0,01	0,03
Error estándar	0,00	0,01

Anexo C

Anexo C1. Absorbancias de las diferentes concentraciones de Ácido gálico para la construcción de la curva de calibración, fenoles totales.

Abs. Ác. Gál	0 ppm	400 ppm	200 ppm	150 ppm	100 ppm	50 ppm
A	0,073	0,16	0,292	0,4	0,417	0,929
B	0,071	0,159	0,288	0,406	0,428	0,933
C	0,078	0,146	0,236	0,336	0,425	0,914
PROM	0,0740	0,1550	0,2720	0,3807	0,4233	0,9253

Anexo C2. Curva de calibración para la determinación fenoles totales.



Anexo C3. Concentración de fenoles totales y estadística descriptiva de las muestras in vitro vs. in vivo.

	mg Eq Ác. Gál./mL extracto	
	In vivo	In vitro
	1,05	0,71
	1,06	0,71
	0,97	0,62
Promedio	1,02	0,68
Desviación estándar	0,05	0,05
Error estándar	0,03	0,03

Anexo D

Anexo D1. Absorbancias medidas en el tiempo para la determinación de la inhibición de enzima catalasa en muestras in vivo.

Catalasa (in vivo)	N° de mediciones	Tiempo (seg)	Medición 1	Medición 2	Medición 3
	0	0	0,355	0,314	0,349
	1	30	0,362	0,36	0,357
	2	60	0,36	0,362	0,356
	3	90	0,36	0,36	0,355
	4	120	0,359	0,359	0,354
	5	150	0,359	0,358	0,353
	6	180	0,357	0,358	0,352
	7	210	0,356	0,355	0,351
ΔA			0,3585	0,35325	0,353375
U/g			1.070,61 U/mL	713,74 U/mL	1.427,48 U/g

Anexo D2. Absorbancias medidas en el tiempo para la determinación de la inhibición de enzima catalasa en muestras in vitro.

Catalasa (in vivo)	N° de mediciones	Tiempo (seg)	Medición 1	Medición 2	Medición 3
	0	0	0,238	0,203	0,278
	1	30	0,249	0,236	0,278
	2	60	0,245	0,235	0,274
	3	90	0,241	0,232	0,268
	4	120	0,238	0,23	0,264
	5	150	0,234	0,226	0,26
	6	180	0,231	0,223	0,256
	7	210	0,228	0,221	0,251
ΔA			0,238	0,22575	0,266125
U/g			5.331,07 U/g	3.554,05 U/g	6.397,29 U/g

Anexo D4. Inhibición de la enzima catalasa

	U/g	
	In vivo	In vitro
	1.070,61	5.331,07
	713,74	3.554,05
	1.427,48	6.397,29
Promedio	1.070,61	5.094,14
Desviación estándar	356,87	1436,35
Error estándar	206,04	829,28

Anexo E

Anexo E1. Absorbancias medidas en el tiempo para la determinación de la inhibición de enzima peroxidasa en muestras in vivo.

Catalasa (in vivo)	N° de mediciones	Tiempo (seg)	Medición 1	Medición 2	Medición 3
	0	0	1,128	1,191	0,878
	1	30	1,224	1,174	1,261
	2	60	1,224	1,174	1,281
	3	90	1,217	1,169	1,27
	4	120	1,212	1,163	1,26
	5	150	1,209	1,159	1,251
	6	180	1,207	1,157	1,244
	7	210	1,205	1,154	1,245
ΔA			1,20325	1,167625	1,21125
U/g			374,71 U/g	374,71 U/g	249,80 U/g

Anexo E2. Absorbancias medidas en el tiempo para la determinación de la inhibición de enzima peroxidasa en muestras in vitro.

Catalasa (in vivo)	N° de mediciones	Tiempo (seg)	Medición 1	Medición 2	Medición 3
	0	0	1,286	0,803	1,228
	1	30	1,279	1,284	1,275
	2	60	1,269	1,295	1,276
	3	90	1,271	1,295	1,274
	4	120	1,271	1,293	1,274
	5	150	1,264	1,278	1,264
	6	180	1,261	1,278	1,263
	7	210	1,256	1,271	1,259
ΔA			1,269625	1,224625	1,264125
U/g			373,17 U/g	149,27 U/g	273,66 U/g

Anexo E3 Inhibición de la enzima peroxidasa.

	U/g	
	In vivo	In vitro
	374,71	373,17
	374,71	149,27
	249,80	273,66
Promedio	333,07	265,37
Desviación estándar	72,12	112,18
Error estándar	41,64	64,77