

**Assessment of the antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from five species of sobralia (orchidaceae) present in Ecuador**

**Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de cinco especies de sobralia (orchidaceae) presentes en el Ecuador**

**Autores:**

García-Reinoso, Evelyn Michelle  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
Maestrante  
Quito – Ecuador



[egarciar5@estups.edu.ec](mailto:egarciar5@estups.edu.ec)



<https://orcid.org/0009-0005-6307-7907>

Cerna-Cevallos, Marco Fernando, Ph.D  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SALESIANA  
Docente Tutor  
Quito – Ecuador



[mcerna@ups.edu.ec](mailto:mcerna@ups.edu.ec)



<https://orcid.org/0000-0002-0911-9900>

Fechas de recepción: 11-MAR-2024 aceptación: 11-ABR-2024 publicación: 15-JUN-2024



<https://orcid.org/0000-0002-8695-5005>

<http://mqrinvestigador.com/>

## Resumen

La familia Orchidaceae cuenta con una notable diversidad, abarcando aproximadamente 775 géneros y 24,500 especies distribuidas en todo el mundo. Ciertas especies dentro del género *Sobralia* se utilizan en la medicina tradicional para tratar inflamaciones, heridas y trastornos gastrointestinales, aunque carecen de respaldo científico suficiente para sus actividades biológicas, el estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de orquídeas del género *Sobralia* presentes en Ecuador, junto con la identificación molecular utilizando el método BARCODE. Las muestras de *Sobralia* se recolectaron en cuatro provincias de Ecuador, seguidas de la preparación de extractos hidroalcohólicos tanto de hojas como de tallos mediante maceración. Además, se determinó la concentración de fenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu, revelando valores más altos en las hojas de las especies *S. ecuadorana* y *S. pulcherima*, correlacionando con una mayor actividad antioxidante demostrada mediante el método de captación de radicales DPPH, donde *S. ecuadorana* (IC50 de 1.52 mg/ml) y *S. pulcherima* (IC50 de 2.08 mg/ml) mostraron los resultados más prometedores. Para la identificación molecular, primero se extrajo el ADN de las muestras utilizando el método de Doyle y Doyle, seguido de la secuenciación mediante análisis de PCR utilizando los marcadores cloroplásticos *matK* y *rpoC1*. Posteriormente, las secuencias obtenidas se refinaron para mejorar su calidad. Los árboles filogenéticos construidos utilizando MEGA 11.0 indicaron la eficacia de estos marcadores en la identificación a nivel de género y especie de las orquídeas, la investigación ofrece una herramienta molecular para la identificación precisa de orquídeas y subraya el potencial farmacéutico de ciertas especies endémicas ecuatorianas basado en su actividad antioxidante.

**Palabras clave:** orquídea; *sobralia*; actividad antioxidante; método barcode; dpph



## Abstract

The Orchidaceae family boasts remarkable diversity, encompassing approximately 775 genera and 24,500 species distributed worldwide. Certain species within the *Sobralia* genus are utilized in traditional medicine to address inflammations, wounds, and gastrointestinal disorders, albeit lacking sufficient scientific backing for their biological activities. This study aimed to assess the antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from five *Sobralia* orchid species present in Ecuador, alongside molecular identification using the BARCODE method. *Sobralia* samples were collected across four provinces of Ecuador, followed by the preparation of hydroalcoholic extracts from both leaves and stems through maceration. Additionally, total phenol concentration was determined using the Folin-Ciocalteu method, revealing higher values in the leaves of *S. ecuadorana* and *S. pulcherima* species, correlating with enhanced antioxidant activity as demonstrated by the DPPH radical scavenging method, where *S. ecuadorana* (IC<sub>50</sub> of 1.52 mg/ml) and *S. pulcherima* (IC<sub>50</sub> of 2.08 mg/ml) exhibited the most promising results. For molecular identification, DNA was first extracted from the samples using the Doyle and Doyle method, followed by sequencing via PCR analysis utilizing chloroplastic markers *matK* and *rpoC1*. Subsequently, the obtained sequences were refined to improve quality. Phylogenetic trees constructed using MEGA 11.0 indicated the effectiveness of these markers in genus and species-level identification of orchids. In conclusion, this research offers a molecular tool for precise orchid identification and underscores the potential pharmaceutical utility of certain endemic Ecuadorian species based on their antioxidant activity.

**Keywords:** orchid; sobralia; antioxidant activity; barcode method; dpph



## Introducción

Las orquídeas son conocidas por su elegancia y una amplia variedad de formas, colores y fragancias. Ecuador, gracias a su ubicación geográfica y biodiversidad, alberga una notable diversidad de estas plantas (Coronado, 2020). La familia Orchidaceae incluye alrededor de 775 géneros y 24,500 especies que se encuentran distribuidas por todo el mundo. Desde tiempos antiguos, las orquídeas han sido utilizadas en la medicina tradicional, especialmente en China, para tratar afecciones como inflamaciones y enfermedades infecciosas (Suta et al., 2017).

Las orquídeas son una de las familias más diversas y grandes del reino vegetal, con más de 25,000 especies identificadas, agrupadas en aproximadamente 700-800 géneros distintos. Son apreciadas por sus exóticas y llamativas flores, lo que ha impulsado su cultivo intensivo y su uso ornamental en arreglos florales y decoración. Además de su diversidad geográfica y taxonómica, las orquídeas son ampliamente cultivadas y comercializadas por sus múltiples usos medicinales y alimenticios (Zhang et al., 2018).

Las plantas se emplean en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, especies de los géneros *Dendrobium* y *Eulophia* son utilizadas en la medicina china y ayurvédica, mientras que géneros como *Ophrys* y *Epipactis* se emplean en Europa para tratar la gastritis (Teoh 2016). Además, algunas orquídeas tienen aplicaciones en la industria alimentaria, ya que los bulbos de ciertas especies contienen un polisacárido llamado glucomanano, utilizado en la elaboración de productos como el "salep" Hossain (2011).

Las vainas secas de orquídeas del género *Vanilla* se han utilizado durante mucho tiempo para producir esencia de vainilla, un popular aromatizante y saborizante Randriamiharisoa et al. (2015). La familia Orchidaceae, que incluye estas plantas, es una de las más grandes dentro de las plantas vasculares, con alrededor de 27,801 especies distribuidas en todo el mundo, especialmente en los trópicos (The Plant List 2013). Sus hojas, tallos, flores y raíces muestran una variedad de adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir en una variedad de hábitats, desde epífitas hasta terrestres (Ruiz, 2020).

Orchidaceae representa una de las familias más grandes de angiospermas y sus especies son altamente valoradas en aplicaciones cosméticas, alimenticias y farmacéuticas debido a sus metabolitos bioactivos (Kumar & Singh, 2023). La distribución global de las orquídeas está influenciada por factores climáticos y, en consecuencia, pueden desarrollarse como litófitas, epífitas, terrestres o saprófitas. Aunque algunas especies son endémicas, su diversidad excepcional se debe principalmente a adaptaciones fisiológicas y a interacciones altamente específicas entre la planta y sus polinizadores (Menchaca, 2011).

Ecuador cuenta con una abundante diversidad de orquídeas, siendo hogar del 14% de las especies descritas a nivel mundial. El país presenta cuatro de las cinco subfamilias reconocidas globalmente, con 273 géneros y 4,032 especies documentadas, de las cuales 1,714 son endémicas. Se estima que al menos 400 especies adicionales se encuentran en proceso de descripción (Gallardo et al., 2021). Se ha demostrado que varios metabolitos secundarios de plantas poseen propiedades antioxidantes, que son beneficiosas para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Pisoschi & Pop, 2015). Entre las plantas que destacan por su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides se encuentran varias familias, como Lamiaceae, Asteraceae y Orchidaceae (Gallego, 2016).

El proceso de autooxidación y el estrés oxidativo se asocian con el desarrollo de enfermedades como el cáncer y la diabetes. Aunque los antioxidantes sintéticos se han utilizado para prevenir estas enfermedades, su uso puede conllevar efectos adversos (Nguyen et al., 2018). Por otro lado, según Kuskoski et al., (2005), los antioxidantes de origen natural podrían representar una alternativa más segura y efectiva para combatir las enfermedades causadas por el daño oxidativo.

En la flora ecuatoriana, diversas especies de orquídeas del género *Sobralia* han mostrado actividad antioxidante en estudios anteriores, asociada principalmente con fenoles y flavonoides. Sin embargo, se desconoce cómo varía esta actividad entre diferentes especies de *Sobralia* presentes en Ecuador (Minh et al., 2016), la falta de información dificulta la identificación de las especies nativas de *Sobralia* con mayor potencial antioxidante, lo que limita el desarrollo de productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios funcionales centrados en la prevención del estrés oxidativo (Surag et al., 2022). Por lo tanto, es crucial investigar la variabilidad de la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos en especies del género *Sobralia*. Siendo el objetivo general evaluar la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de cinco especies del género *Sobralia* (Orchidaceae) presentes en el Ecuador mediante el método del radical  $\alpha, \alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidrazilo (DPPH) en comparación con el estándar de ácido Ascórbico, con el fin de establecer la especie con mayor capacidad de captación de radicales libres.

## Material y Métodos

### Recolección del material vegetal

Durante los meses de mayo y agosto de 2023, se recolectaron muestras de 7 individuos pertenecientes a 4 especies del género *Sobralia* en 4 provincias de Ecuador. Los datos de recolección se registraron en el libro de campo Marco Cerna. Las muestras para el estudio fitoquímico se obtuvieron cortando hojas y tallos de los individuos, que fueron lavados y desinfectados en el laboratorio. Para el estudio molecular, se recolectó tejido foliar joven de los individuos, el cual se almacenó en bolsas etiquetadas y luego se trasladó al laboratorio



utilizando sílica gel como secante para eliminar la humedad. Las muestras fueron procesadas y almacenadas en un congelador en la Universidad Politécnica Salesiana, Campus El Girón.

### Obtención de los extractos mediante Maceración

Se aplicó la técnica de maceración según Clavijo & Cruz (2017), utilizando una relación de 1:3 entre el material vegetal y el solvente (etanol al 70%). El proceso se llevó a cabo durante 8 días en frascos cubiertos con papel aluminio y mantenidos en oscuridad total. Posteriormente, los extractos se filtraron y concentraron utilizando un rotavapor a presión reducida y 70°C hasta alcanzar una relación de 1:1 entre el volumen del extracto y la masa inicial del material vegetal. Los extractos concentrados se almacenaron refrigerados para su posterior análisis de compuestos fenólicos totales.

### Determinación de los compuestos fenólicos totales

Se empleó el método de Folin-Ciocalteu para cuantificar los fenoles totales, preparando soluciones patrón de ácido gálico con concentraciones conocidas para una curva de calibración. Se realizaron soluciones patrón de ácido gálico en etanol con concentraciones de 100, 200, 300, 500 y 1000 ppm, a las cuales se les agregó reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio al 20%. Tras un período de reposo, se midió la absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro JASCO V-730 para obtener una curva de calibración, el procedimiento se llevó a cabo por triplicado, utilizando el blanco con los mismos volúmenes de reactivo y agua destilada.

**Tabla 1. Preparación de estándares para curva de calibración para fenoles totales.** - Muestra los volúmenes y concentraciones utilizados para preparar diferentes estándares de ácido gálico, los cuales servirán como referencia para cuantificar fenoles totales mediante un método espectrofotométrico, como el ensayo de Folin-Ciocalteu.

N Tubo	Concentración Ácido Gálico ppm	Volumen Ácido Gálico ml	Volumen Agua destilada ml	Reactivo de Folin-Ciocalteu ml	Carbonato de Sodio 20%
Blanco	-----	-----	4	0,25	0,75
Estándar 1	100	0,05	3,95	0,25	0,75
Estándar 2	200	0,05	3,95	0,25	0,75
Estándar 3	300	0,05	3,95	0,25	0,75
Estándar 4	500	0,05	3,95	0,25	0,75
Estándar 5	1000	0,05	3,95	0,25	0,75

Las muestras de los 7 individuos de *Sobralia* se analizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se disolvieron en etanol al 96% con una proporción de 1/10 y se cuantificaron los fenoles totales utilizando la ecuación obtenida a partir de la regresión lineal de la curva de calibración.

#### Ecuación 1. Determinación de la cantidad de fenoles totales en los 7 individuos de *Sobralia*



$$Y=mx-b$$

**Donde:**

y=absorbancia

x=concentración de las soluciones de ácido gálico

m= pendiente de la recta

b=Intersección a la recta

**Determinación de la Actividad Antioxidante**

Se evaluó la actividad antioxidante utilizando un espectrofotómetro JASCO V-730 y el software Spectra Manager TM. Se preparó una solución patrón de DPPH en etanol grado analítico siguiendo el método descrito por Paudel et al. (2015) y se almacenó en refrigeración a 5°C. Asimismo, se preparó una solución de ácido Ascórbico siguiendo la metodología de Noriega et al. (2015), y se leyeron los tubos de ensayo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517nm, luego de dejarlos en agitación a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

**Tabla 2. Método de diluciones DPPH.** – La tabla muestra las diluciones utilizadas de DPPH para evaluar la capacidad antioxidante de las diferentes muestras.

Frascos	Muestra o Vitamina C	DPPH	Etanol 96%
DPPH	----	2,9 ml	100 uL
1	2 µL	2,9 ml	98 µL
2	5 µL	2,9 ml	95 µL
3	10 µL	2,9 ml	90 µL
4	20 µL	2,9 ml	80 µL
5	50 µL	2,9 ml	50 µL
6	80 µL	2,9 ml	20 µL

Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 2. Porcentaje de inhibición del radical DPPH**

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = \left( 1 - \frac{Am - Abm}{A_{DPPH}} \right) \times 100$$

**Fuente:** (Molyneux, 2004).

**Dónde:**

Am: Representa la absorbancia de DPPH con el extracto (o vitamina C)

Abm: Representa la absorbancia de DPPH sin el extracto.

**Análisis molecular**

El estudio molecular se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Campus Girón, en la ciudad de Quito. Se empleó la metodología de DNA BARCODE para analizar las regiones matK y rpoC1 del genoma cloroplástico.



## Extracción del ADN

Se llevaron a cabo dos protocolos para la extracción de ADN: el Protocolo Directo utilizando el Kit Platinum Direct PCR Universal Master Mix de Invitrogen, y el Protocolo Modificado de Doyle y Doyle. En el primero, se maceró tejido vegetal en un tubo con Dilution Buffer, y luego se tomó una muestra del sobrenadante para la amplificación por PCR. En el segundo, se trituró el material vegetal con Buffer de Lisis y otros reactivos, se incubó, se centrifugó, se agregó fenol:cloroformo, se precipitó con isopropanol, y se lavó con etanol antes de resuspender el ADN en TE 1X. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Además, se realizó la reacción de cadena de polimerasa (PCR) para amplificar las regiones matK y rpoC1 del ADN utilizando un termociclador. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel para su posterior identificación molecular.

**Tabla 3. Composición de la mezcla PCR.** - La tabla muestra los reactivos y las cantidades necesarias para preparar mezcla de reacción estándar utilizada en la técnica de PCR.

Reactivo	Volumen (µl) para 1 muestra
<i>Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix</i>	12,5
<i>Primer forward</i>	0,5
<i>Primer reverse</i>	0,5
Agua libre de ARNasas	10,5
ADN	1
<b>Total</b>	<b>25</b>

**Fuente:** (invitrogen, 2019)

Los productos amplificados de PCR fueron secuenciados por la técnica Sanger clásica automatizada en la empresa MacroGen Inc en Corea. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas de ruido de fondo y alineadas utilizando el programa Finch TV y el sistema MUSCLE. Se construyeron árboles filogenéticos utilizando el método de Máxima Verosimilitud con el modelo evolutivo Tamura 3-parameter con distribución gamma (T92+G) y un Bootstrap de 500 en el programa MEGA v 11.0. Finalmente, las secuencias se compararon mediante la herramienta BLAST del Genbank para su análisis.

## Resultados

### Obtención de los extractos Hidroalcohólicos.

Se recolectaron 14 extractos hidroalcohólicos a una concentración 1:1, obtenidos de 5 especies del género *Sobralia* (7 de hojas y 7 de tallos), como se detalla en las tablas 4 y 5. En el análisis molecular de los 7 individuos recolectados, se identificaron 5 especies distintas, mientras que las 2 especies restantes fueron repeticiones. Las especies identificadas fueron



Sobralia Sp, Sobralia rosea, Sobralia cf. virginalis, Sobralia pulcherrima y Sobralia ecuadorana.

**Tabla 4. Volúmenes de extracción de diferentes especies de hojas de Sobralia.** – Presenta el número de colección registrado en el libro de campo (M cerna), nombre de la especie, peso de las hojas en g (gramos), volumen del extracto recuperado y volumen del extracto concentrado en ml (mililitros). Los datos indican que se realizaron extracciones hidroalcohólicas mediante maceración a partir de hojas de distintas especies de *Sobralia*.

No. de muestras	Número de colección	Muestra	Peso de la hoja g	Volumen del extracto recuperado (ml)	Volumen del extracto concentrado (ml)
1	4707	<i>Sobralia rosea</i>	264,0	892	264,0
2	4741	<i>Sobralia sp.</i>	126,2	479	126,0
3	4742	<i>Sobralia cf. virginalis</i>	169,5	608	169,0
4	4747	<i>Sobralia ecuadorana</i>	188,3	665	188,0
5	4748	<i>Sobralia pulcherrima</i>	201,4	600	201,0
6	4749	<i>Sobralia ecuadorana</i>	101,6	400	101,0
7	4951	<i>Sobralia ecuadorana</i>	200,5	650	200,0

**Tabla 5. Volúmenes de extracción de diferentes especies de hojas de Sobralia.** - Presenta el número de colección registrado en el libro de campo (M cerna), muestra, nombre de la especie, peso de los tallos en gramos (g), volumen del extracto recuperado y volumen del extracto concentrado en mililitros (ml). Los datos indican que se realizaron extracciones hidroalcohólicas mediante maceración a partir de tallos de distintas especies de *Sobralia*.

No. de muestras	Número de colección	Muestra	Peso de los tallos g	Volumen del extracto recuperado (ml)	Volumen del extracto concentrado (ml)
1	4707	<i>Sobralia rosea</i>	114,00	480	114,0
2	4741	<i>Sobralia sp.</i>	96,30	388	96,0
3	4742	<i>Sobralia cf. virginalis</i>	179,70	525	179,0
4	4747	<i>Sobralia ecuadorana</i>	114,75	400	114,0
5	4748	<i>Sobralia pulcherrima</i>	150,14	300	150,0
6	4749	<i>Sobralia ecuadorana</i>	101,64	320	101,0
7	4951	<i>Sobralia ecuadorana</i>	152,71	400	152,0

El método de extracción por maceración fue eficiente para obtener metabolitos secundarios a partir de tejidos de hojas y tallos del género *Sobralia*. Los volúmenes de extracto recuperado varían entre las especies, desde 300 ml para *S. pulcherrima* hasta 665 ml para *S. ecuadorana* de hojas y tallos, las diferencias pueden atribuirse a variaciones en la composición química y el contenido de compuestos extractables en cada especie. El método de extracción utilizado, basado en la maceración, favorece la difusión completa de los compuestos activos al romper las paredes y membranas celulares del material vegetal, aumentando la superficie de contacto del solvente. La mezcla hidroalcohólica empleada permite extraer una amplia gama de compuestos, combinando las propiedades solventes del agua y el alcohol.

### Determinación de Fenoles totales



Se determinó la concentración de fenoles totales en cada muestra mediante una curva de calibración con diferentes concentraciones de una solución estándar de ácido gálico, midiendo la absorbancia de las muestras a 765 nm. La curva de calibración mostró un valor de R<sup>2</sup> de 0,9994, indicando una linealidad aceptable. La ecuación de la curva ( $y = 0,0007x + 0,0205$ ) se utilizó para determinar las concentraciones de los extractos evaluados, cuyos valores se presentan en las tablas a continuación:

**Tabla 6.- Concentración de fenoles totales en extractos de hojas de diferentes especies de *Sobralia*.** - La tabla presenta los valores de absorbancia a 765 nm (ABS), los cuales se utilizan para calcular la concentración de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. Se muestran las concentraciones de fenoles totales expresadas en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por ml de extracto, así como las concentraciones promedio para cada especie de *Sobralia* analizada.

Número de colección	Muestra	ABS 765nm	Concentración de fenoles totales (mg EAG /ml de extracto)	Concentración promedio de fenoles totales
4707	<i>Sobralia rosea</i>	0,2869	3,81	3,63±0,30
		0,2507	3,29	
		0,2863	3,80	
		0,4265	5,80	
4741	<i>Sobralia sp.</i>	0,4253	5,78	5,78±0,20
		0,4018	5,45	
4742	<i>Sobralia cf. virginalis</i>	0,3852	5,21	5,09±0,19
		0,3617	4,87	
		0,3852	5,21	
4747	<i>Sobralia ecuadorana</i>	0,6138	8,48	8,52±0,07
		0,6221	8,59	
		0,6143	8,48	
4748	<i>Sobralia pulcherrima</i>	0,5713	7,87	7,75±0,12
		0,5617	7,73	
		0,5552	7,64	
		0,6975	9,67	
4749	<i>Sobralia ecuadorana</i>	0,6992	9,70	9,67±0,03
		0,6956	9,64	
4751	<i>Sobralia ecuadorana</i>	0,6987	9,69	9,70±0,01
		0,7001	9,71	
		0,6998	9,70	

En la identificación molecular de las 7 muestras recolectadas, se obtuvieron 5 especies distintas de *Sobralia* debido a que 2 especies se repitieron. Las especies identificadas fueron *Sobralia sp*, *Sobralia rosea*, *Sobralia c.f. virginalis*, *Sobralia pulcherrima* y *Sobralia ecuadorana*. Los extractos evaluados de estas especies mostraron una cantidad considerable de compuestos fenólicos, especialmente los provenientes de *Sobralia ecuadorana* de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Cotopaxi, que presentaron la mayor concentración de fenoles:  $8,52 \pm 0,07$  mg GAE/ml,  $9,67 \pm 0,03$  mg GAE/ml y  $9,70 \pm 0,01$  mg GAE/ml, respectivamente. Se observó que las muestras de Cotopaxi tenían más fenoles que las de Santo Domingo de los Tsáchilas, lo que podría atribuirse a las diferencias en las condiciones ambientales entre estas zonas, los resultados concuerdan con estudios previos que reportaron concentraciones similares de fenoles totales en extractos de orquídeas, lo que resalta el potencial bioactivo de estas plantas.

**Tabla 7. Concentración de fenoles totales en extractos de tallos de diferentes especies de *Sobralia*.** - La tabla presenta los valores de absorbancia a 765 nm (ABS), los cuales se utilizan para calcular la concentración de fenoles totales. Se muestran las concentraciones de fenoles totales expresadas en mg equivalentes de ácido



gálico (EAG) por ml de extracto, así como las concentraciones promedio para cada especie de *Sobralia* analizada.

Número de colección	Muestra	ABS 765nm	Concentración de fenoles totales (mg EAG /ml de extracto)	Concentración promedio de fenoles totales
4707	<i>Sobralia rosea</i>	0,1952	2,50	2,50±0,24
		0,2249	2,92	
		0,1952	2,50	
4741	<i>Sobralia sp</i>	0,3669	4,95	4,80±0,07
		0,3565	4,80	
		0,3622	4,88	
4742	<i>Sobralia cf. virginalis</i>	0,3325	4,46	4,50±0,07
		03412	4,58	
		0,3331	4,47	
4747	<i>Sobralia ecuadorana</i>	0,5015	6,87	6,88±0,02
		0,5034	6,90	
		0,5016	6,87	
4748	<i>Sobralia pulcherrima</i>	0,4316	5,87	5,73±0,24
		0,4029	5,46	
		0,4313	5,87	
4749	<i>Sobralia ecuadorana</i>	0,5531	7,61	7,65±0,06
		0,5609	7,72	
		0,5531	7,61	
4751	<i>Sobralia ecuadorana</i>	0,5685	7,83	7,70±0,19
		0,5442	7,48	
		0,5649	7,78	

Los extractos de tallos de la especie *Sobralia ecuadorana*, mostraron una concentración de fenoles mayor en las muestras 4747 ( $6,88 \pm 0,02$  mg GAE/ml), 4749 ( $7,65 \pm 0,06$  mg GAE/ml) y 4751 ( $7,70 \pm 0,19$  mg GAE/ml). Sin embargo, se observa en la tabla a continuación que las hojas presentan una cantidad significativamente mayor de compuestos fenólicos en comparación con los tallos para todas las especies del género *Sobralia* estudiadas, la diferencia puede atribuirse a que las hojas están especializadas para la fotosíntesis, proceso que requiere antioxidantes como los fenoles para proteger los cloroplastos de los radicales libres. Por otro lado, los tallos, al sostener a la planta y conducir la savia, no necesitan la presencia de estos compuestos, lo que resulta en un menor contenido de fenoles en comparación con las hojas. Las rutas metabólicas que forman los fenoles, como la ruta del ácido shikímico, ocurren principalmente en las hojas, donde las enzimas están más activas debido a las necesidades de la fotosíntesis y la formación de metabolitos secundarios. Además, las hojas tienen mayores requerimientos de compuestos fenólicos como mecanismo de defensa contra la radiación solar, el herbivorismo y las infecciones por patógenos.

### Actividad Antioxidante

Se observa que los extractos de hojas de las muestras de *Sobralia* presentan un contenido más alto de fenoles totales en comparación con los extractos de tallos. Dado que los compuestos fenólicos son responsables de la actividad antioxidante en las plantas, se seleccionaron los



extractos de hojas para evaluar esta actividad. La tabla 9 muestra los porcentajes de inhibición del radical DPPH por los extractos obtenidos de las 7 muestras del género *Sobralia*, junto con la concentración expresada en mg/ml. Se observa que los extractos de *Sobralia* ecuatorana presentan los mayores porcentajes de inhibición, indicando una mayor actividad antioxidante en estas muestras.

**Tabla 8. IC 50 obtenidos en los 7 extractos del género *Sobralia*.** - La tabla muestra los valores obtenidos de la concentración inhibitoria media, IC 50 es la concentración del extracto necesaria para inhibir el 50% de la actividad del radical DPPH.

No. de Colección	Especies	IC50
4707	<i>Sobralia Rosea</i>	4,40
4741	<i>Sobralia sp.</i>	2,46
4742	<i>Sobralia cf. Virginialis</i>	2,54
4747	<i>Sobralia ecuatorana</i>	1,75
4748	<i>Sobralia pulcherima</i>	2,08
4749	<i>Sobralia ecuatorana</i>	1,52
4751	<i>Sobralia ecuatorana</i>	1,58

Se realizaron análisis estadísticos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *Sobralia*. Se encontraron diferencias significativas en los valores de IC50 entre las cinco especies evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), lo cual sugiere que existe variabilidad en la actividad antioxidante entre las especies estudiadas. La prueba comparativa de Tukey reveló que las muestras 4749 y 4751 presentan una actividad antioxidante estadísticamente similar al ácido ascórbico (control positivo) y tienen un mayor potencial antioxidante en comparación con otras muestras. Los resultados mostraron que a mayor concentración de los extractos, se observó un incremento en el porcentaje de inhibición del radical DPPH. *Sobralia* ecuatorana mostró los valores más altos de inhibición, indicando un potencial antioxidante superior entre las especies estudiadas.

Los valores de IC50 obtenidos para las especies de *Sobralia* se encuentran en un rango similar o superior a los reportados para otras especies de orquídeas en estudios previos, lo cual sugiere que las especies de *Sobralia* poseen una actividad antioxidante notable y potencialmente superior a la de otros géneros de orquídeas, los resultados abren nuevas perspectivas para investigaciones futuras sobre los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante en las especies de *Sobralia*, así como sus posibles aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética.

### Análisis molecular

Se llevó a cabo la extracción de ADN de seis individuos de cuatro especies del género *Sobralia* utilizando dos métodos diferentes: Doyle y Doyle (1987) modificado, y el kit Platinum Direct Universal PCR Master Mix. Los valores de la razón de absorbancia A260/A280 obtenidos con el método modificado de Doyle y Doyle, en el rango óptimo de 1,79 a 1,93, indican una pureza adecuada del ADN extraído, gracias a los pasos adicionales

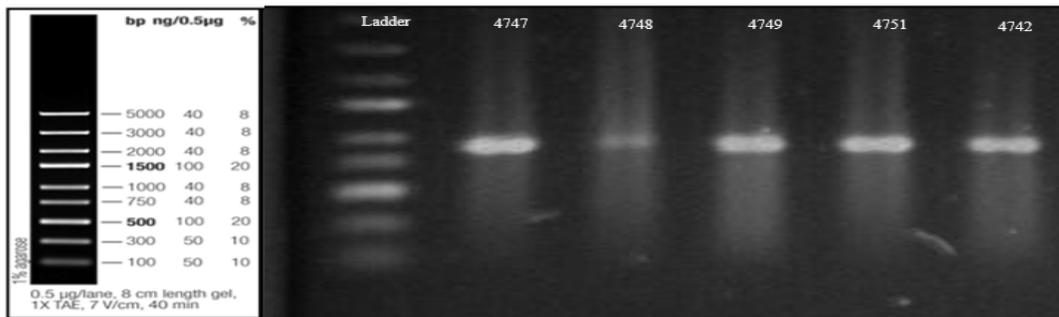


de purificación y precipitación que elimina eficientemente contaminantes. Por otro lado, los valores más bajos de la razón A260/A280, en el rango de 1,24 a 1,66 obtenidos con el kit Platinum Direct, sugieren la presencia de contaminantes residuales en el ADN. Aunque este ADN puede ser utilizado para la PCR, el método modificado de Doyle y Doyle permite una eliminación más efectiva de contaminantes, garantizando la integridad y calidad del material genético.

El método de Doyle y Doyle modificado fue seleccionado por su capacidad para obtener ADN de mayor pureza, esencial para resultados confiables en análisis moleculares posteriores. Además, este método fue comparado con estudios previos en otros géneros de orquídeas, confirmando su eficiencia en la extracción de ADN. Es importante destacar que no fue posible extraer ADN de una muestra debido a dificultades técnicas durante la experimentación con el tejido vegetal.

### Reacción en cadena de la polimerasa PCR convencional

Se llevaron a cabo la amplificación de los genes *matK* y *rpoC1* a partir de los resultados de la extracción de ADN. Para el gen *matK*, se trabajó con seis individuos, de los cuales cinco mostraron resultados positivos, mientras que para el gen *rpoC1*, se analizaron seis muestras y se obtuvieron resultados positivos para todas ellas. En cuanto a la amplificación del gen *matK*, se observaron resultados positivos para cinco de las seis muestras analizadas, correspondientes a tres especies del género *Sobralia*. Los fragmentos de ADN obtenidos tuvieron una longitud aproximada de 750 pares de bases (pb), como se muestra en la Figura a continuación.



**Figura 1. Electroforesis en gel de la región *matK* de muestras del género *Sobralia*.** - En el carril de la izquierda se observa una escalera de bandas que corresponde al marcador de peso molecular (100-500 pb) Ladder de Thermo Scientific, carriles de la derecha a izquierda se observa muestras de *Sobralia* 4747 (*S. ecuadorana*); 4748 (*S. pulcherima*); 4749 (*S. ecuadorana*); 4751 (*S. ecuadorana*); 4742 (*S. c.f. virginalis*).

Los resultados obtenidos en la amplificación de los genes *matK* y *rpoC1* muestran similitudes con estudios previos realizados en otros géneros botánicos, como *Passiflora*, *Maxillaria*, *Catasetum*, *Epidendrum* y *Bomarea*, según investigaciones de Miño (2018), Molina (2020) y Callatasig & Miranda (2023), respectivamente. Según Alvarado et al. (2015), el tamaño de los

fragmentos amplificados para el marcador molecular matK puede variar dependiendo de la especie o variante específica analizada, con un rango típico entre 750 y 800 pares de bases, la variabilidad se debe a mutaciones y cambios en la secuencia de ADN a lo largo de la evolución. Sin embargo, la muestra 4741 no mostró bandas visibles durante la electroforesis en gel de agarosa después de la amplificación para la región matK. Según Li et al. (2021), esto podría atribuirse a la degradación del ADN, presencia de inhibidores de la Taq polimerasa, divergencia en la secuencia de los cebadores para esa especie o contaminación con nucleasas que degradaron el producto de PCR.

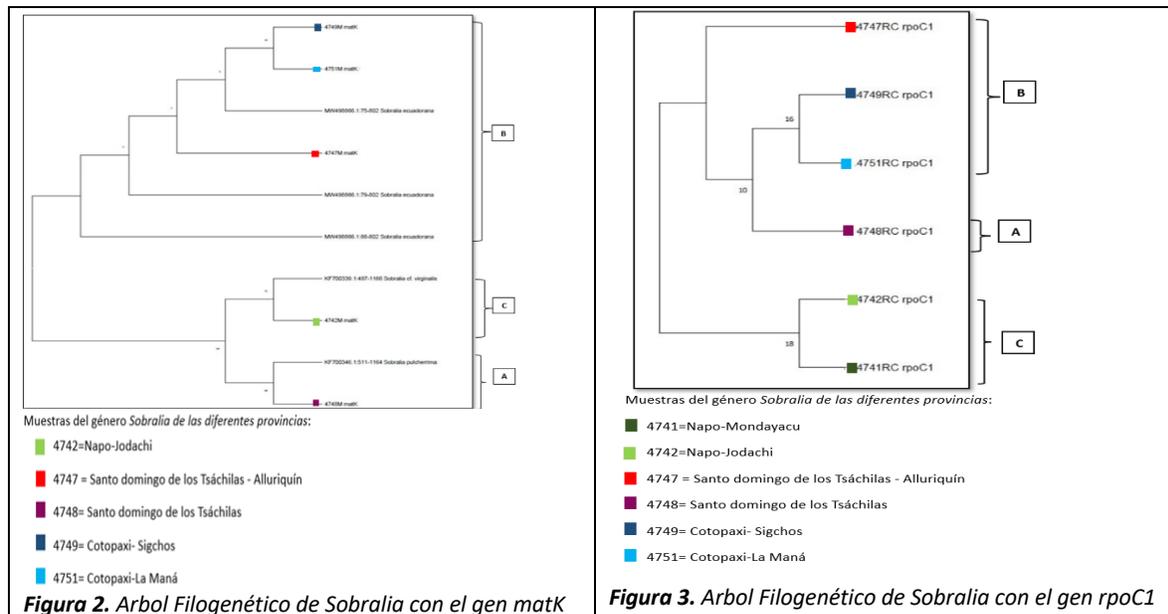
Los resultados de la amplificación de la región rpoC1 mediante PCR convencional fueron positivos para las seis muestras analizadas, correspondientes a cuatro especies del género *Sobralia*. Se lograron fragmentos de ADN de aproximadamente 500 pares de bases en los individuos. La detección de estas bandas del tamaño esperado indica un éxito en la amplificación del marcador rpoC1, ampliamente utilizado en estudios filogenéticos de plantas. La obtención de estos resultados positivos demuestra la eficacia de la técnica de PCR convencional y la idoneidad de los cebadores utilizados para amplificar la región rpoC1 en estas especies de orquídeas, los hallazgos son consistentes con investigaciones previas realizadas en otros géneros botánicos, como *Restrepia*, *Góngora* y *Epidendrum nocturnum*, según estudios realizados por Endara & Ocaña (2022), Rojas & Silva (2023) y Ocaña & Valencia (2023), respectivamente.

**Tabla 9. Identificación molecular de cuatro especies del género *Sobralia* mediante los softwares BLAST y BOLDSYSTEM, adicionalmente se presenta la identificación morfológica.** – Se presenta número de colección en el libro de campo (M Cerna), especímenes analizados mediante BLAST que compara secuencias con bases de datos para identificación por similitud y BOLDSYSTEM especializada en análisis de códigos de barras de ADN.

Numero de colección	BLAST		BOLDSYSTEM		IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA
	Especimen	Identidad (%)	Especimen	Identidad (%)	
4742	KF700339 <i>Sobralia cf. Virginalis</i>	100%	GBVX5342-15: KF700339 <i>Sobralia cf. Virginalis</i>	100%	<i>Sobralia Rosea</i>
4747	MW498866 <i>Sobralia ecuadorana</i>	100%	GBVC934-11: EU490710 <i>Sobralia warszewiczii</i>	99,59%	<i>Sobralia ecuadorana</i>
4748	KF700346 <i>Sobralia pulcherrima</i>	100%	GBVX5349-15: KF700346 <i>Sobralia pulcherrima</i>	100%	<i>Sobralia pulcherrima</i>
4749	MW498866 <i>Sobralia ecuadorana</i>	100%	GBVC934-11 EU490710 <i>Sobralia warszewiczii</i>	99,59%	<i>Sobralia ecuadorana</i>
4751	MW498866 <i>Sobralia ecuadorana</i>	100%	GBVC934-11 EU490710 <i>Sobralia warszewiczii</i>	99,58%	<i>Sobralia ecuadorana</i>

## Filogenia

Se construyeron dos árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 11 y secuencias procesadas de la base de datos GENBANK para especies del género *Sobralia*, los árboles se basaron en las secuencias de los marcadores *matK* y *rpoC1*, respectivamente. Los resultados de la construcción de los árboles filogenéticos se presentan en la Figura 2 (*matK*) y Figura 3 (*rpoC1*).



Para el análisis filogenético del gen *matK*, se utilizaron datos moleculares y morfológicos con el objetivo de esclarecer las relaciones evolutivas entre diferentes muestras de orquídeas del género *Sobralia* y especies relacionadas. La reconstrucción del árbol filogenético basado en el gen *matK* se realizó utilizando cinco secuencias de la base de datos GENBANK. Los resultados del análisis del gen *rpoC1* ratifican la identificación taxonómica de las muestras en tres grupos principales:

Grupo A: El individuo 4748 corresponde a *S. pulcherrima* con un 100% de similitud, mostrando una estrecha relación evolutiva con *S. ecuadorana* (4747).

Grupo B: Los individuos 4747, 4749 y 4751 son identificados como *S. ecuadorana* con un 100% de similitud, lo que confirma su agrupación en este clado.

Grupo C: Los individuos 4741 y 4742, aunque estrechamente relacionados, representan especies distintas. El 4742 es identificado como *S. cf. viginalis*, mientras que el 4741 podría representar un taxón no descrito previamente en las bases de datos.

El marcador *rpoC1* mostró una mayor utilidad que el gen *matK* en la amplificación y análisis de la muestra 4741, indicando una posible limitación de este último debido a la universalidad

de los cebadores empleados. Sin embargo, la baja similitud con especies comparadas sugiere la necesidad de más información molecular y morfológica para determinar su identidad. Estudios previos con otros géneros de orquídeas respaldan la utilidad del gen rpoC1 para la identificación molecular de especies vegetales, destacando su capacidad para revelar patrones de mutación característicos entre especies.

## Discusión

La obtención de extractos hidroalcohólicos mediante el método de maceración resultó ser eficiente para extraer metabolitos secundarios de hojas y tallos de diferentes especies del género *Sobralia*. Los volúmenes de extracto recuperado variaron entre especies, lo que sugiere diferencias en la composición química y el contenido de compuestos extractables. Por ejemplo, el volumen recuperado fue mayor para *Sobralia ecuadorana* en comparación con *Sobralia pulcherrima*, tanto en hojas como en tallos.

Estas variaciones pueden estar influenciadas por la estructura celular de cada especie y la distribución de los metabolitos en los tejidos vegetales. Además, la elección de solventes hidroalcohólicos favoreció la extracción de una amplia gama de compuestos, aprovechando las propiedades solventes tanto del agua como del alcohol. Es importante destacar que la eficacia de la extracción puede influir en los resultados posteriores de análisis, como la actividad antioxidante o la identificación de compuestos bioactivos. Por lo tanto, la estandarización del método de extracción es fundamental para garantizar la reproducibilidad de los resultados y la comparabilidad entre muestras.

La determinación de fenoles totales en extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de diferentes especies del género *Sobralia* reveló información valiosa sobre la composición química y el potencial bioactivo de estas plantas. Mediante la construcción de una curva de calibración con ácido gálico como estándar, se logró cuantificar la concentración de fenoles totales en cada muestra, proporcionando una medida indirecta de su actividad antioxidante y otros efectos beneficiosos para la salud.

Los resultados obtenidos mostraron que las especies de *Sobralia* estudiadas presentan variaciones significativas en la concentración de fenoles totales, tanto en hojas como en tallos. *Sobralia ecuadorana*, en particular, mostró la mayor concentración de fenoles totales en ambos tipos de tejidos, destacándose por su potencial antioxidante y fitoquímico, la variabilidad en la concentración de fenoles entre especies puede estar influenciada por factores genéticos, ambientales y de desarrollo, lo que resalta la importancia de estudios detallados para comprender mejor la biosíntesis y la función de estos compuestos en las plantas.

Además, se observó una diferencia significativa en la concentración de fenoles entre hojas y tallos para todas las especies analizadas. Las hojas, al ser el principal sitio de fotosíntesis y síntesis de metabolitos secundarios, presentaron una concentración mucho mayor de fenoles totales en comparación con los tallos, la diferencia puede atribuirse a las diferentes funciones y requerimientos metabólicos de estos tejidos, donde las hojas tienen una mayor necesidad de compuestos fenólicos como mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo y los daños ambientales.

El estudio de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de hojas de diferentes especies del género *Sobralia* reveló una interesante variabilidad en su capacidad para inhibir el radical DPPH. Los resultados mostraron que los extractos de *Sobralia* ecuatorana exhibieron los mayores porcentajes de inhibición, lo que sugiere una alta actividad antioxidante en estas muestras, la observación es consistente con el hecho de que *Sobralia* ecuatorana también mostró la concentración más alta de fenoles totales, lo que respalda la relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en las plantas.

La diferencia en la actividad antioxidante entre las especies estudiadas fue estadísticamente significativa, lo que indica que hay una variabilidad real en la capacidad antioxidante de las diferentes especies de *Sobralia*. Específicamente, las muestras 4749 y 4751 mostraron una actividad antioxidante similar al ácido ascórbico, que se utilizó como control positivo, lo que sugiere un alto potencial antioxidante en estas especies, los resultados son importantes porque sugieren que ciertas especies de *Sobralia* pueden ser fuentes prometedoras de antioxidantes naturales, con posibles aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Además, los valores de IC50 obtenidos para las especies de *Sobralia* están dentro de un rango similar o superior a los reportados para otras especies de orquídeas en estudios previos, lo cual indica que las especies de *Sobralia* poseen una actividad antioxidante notable, posiblemente incluso superior a la de otros géneros de orquídeas, los hallazgos resaltan la importancia de *Sobralia* como un género de interés para investigaciones futuras sobre compuestos bioactivos y su potencial aplicación en diversas industrias.

El análisis molecular llevado a cabo en este estudio proporciona información valiosa sobre la diversidad genética y la identificación taxonómica de las especies del género *Sobralia* estudiadas. Los resultados de la extracción de ADN muestran que el método modificado de Doyle y Doyle fue más efectivo para obtener ADN de alta pureza en comparación con el kit Platinum Direct Universal PCR Master Mix, la pureza del ADN es crucial para garantizar resultados confiables en los análisis moleculares posteriores.

Los resultados de la amplificación por PCR de los genes *matK* y *rpoC1* revelaron la eficacia de la técnica en la detección de los fragmentos de ADN esperados en la mayoría de las muestras. Sin embargo, la ausencia de bandas visibles en la electroforesis en gel de agarosa

para la muestra 4741 después de la amplificación del gen *matK* sugiere posibles problemas como la degradación del ADN o la presencia de inhibidores que afectaron la reacción de PCR.

El análisis de secuenciación y comparación con las bases de datos BLAST y BOLDSYSTEM proporcionó información adicional sobre la identidad de las especies estudiadas. Los resultados obtenidos mostraron una alta similitud entre las secuencias de las muestras y las especies de *Sobralia* en las bases de datos, lo que respalda la identificación morfológica previa. Sin embargo, se observaron discrepancias en la identificación entre los softwares BLAST y BOLDSYSTEM para algunas muestras, lo que destaca la importancia de utilizar múltiples herramientas de análisis para una identificación precisa.

El análisis filogenético realizado mediante la construcción de árboles basados en los genes *matK* y *rpoC1* proporciona información valiosa sobre las relaciones evolutivas dentro del género *Sobralia* y entre especies relacionadas, los árboles filogenéticos son herramientas fundamentales para comprender la diversidad genética y la evolución de las especies de orquídeas estudiadas.

En el árbol filogenético construido a partir del gen *matK*, se observa la agrupación de las muestras de *Sobralia* en diferentes clados, lo que refleja su divergencia evolutiva. Se identificaron especies como *S. pulcherrima* y *S. ecuadorana*, mostrando relaciones cercanas entre sí, lo que coincide con estudios previos sobre la filogenia del género *Sobralia*. Sin embargo, se destacan discrepancias en la identificación de ciertas muestras, lo que sugiere la necesidad de más investigaciones para clarificar su taxonomía y relaciones filogenéticas.

Por otro lado, el análisis del gen *rpoC1* ratifica los resultados de identificación taxonómica de las muestras en tres grupos principales, proporcionando una visión complementaria a los hallazgos obtenidos con el gen *matK*. Específicamente, se observa una mayor utilidad del gen *rpoC1* en la amplificación y análisis de la muestra 4741, resaltando su potencial para superar limitaciones asociadas con otros marcadores moleculares.

Es importante destacar que la combinación de análisis moleculares y morfológicos es esencial para una identificación precisa y una comprensión completa de la filogenia del género *Sobralia*. Los resultados obtenidos en este estudio resaltan la importancia de utilizar múltiples herramientas y enfoques metodológicos para abordar preguntas taxonómicas y filogenéticas en la investigación botánica.

## Conclusiones



El método de extracción utilizando una solución hidroalcohólica resultó efectivo para obtener metabolitos secundarios polares y semipolares de las especies de *Sobralia* estudiadas, el enfoque permitió la obtención de compuestos fenólicos y otros fitoquímicos relevantes, como se demostró en los resultados de la actividad antioxidante y la cuantificación de fenoles totales.

El extracto de *Sobralia* ecuatorana exhibió la mayor capacidad antioxidante y capacidad para neutralizar los radicales libres del DPPH en comparación con las otras especies evaluadas. Los valores de IC<sub>50</sub> más bajos, entre 1,52 y 1,75 mg/ml, indican una actividad antioxidante superior. Por lo tanto, el extracto de *S. ecuatorana* presenta potencial como ingrediente para productos antioxidantes en diversas industrias.

Los extractos de hojas de *Sobralia* ecuatorana de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas (4747) y Cotopaxi (4749, 4751) mostraron las concentraciones más altas de compuestos fenólicos totales, entre 8,52 y 9,70 mg GAE/ml, lo cual puede explicar su destacada actividad antioxidante. Además, se observó que las hojas acumulan más compuestos fenólicos que los tallos en todas las especies de *Sobralia* estudiadas, sugiriendo una función protectora contra factores ambientales.

El análisis molecular con el gen *matK* identificó correctamente especies como *S. cf. virginalis* (4742); *S. ecuatorana* (4747, 4749 y 4951); y *S. pulcherrima* (4748). Sin embargo, la muestra 4741 no pudo ser amplificada, posiblemente debido a la degradación del ADN u otros factores. Por otro lado, el marcador *rpoC1* corroboró la identificación de estas muestras y sugirió que la muestra 4741 podría representar un taxón no descrito previamente, mostrando una divergencia en el árbol filogenético.

Los resultados indican que el gen *matK* es útil para la identificación de especies de *Sobralia*, aunque en casos específicos puede ser necesario complementarlo con otros marcadores como *rpoC1* o análisis adicionales para resolver identidades taxonómicas desconocidas. La técnica BARCODE basada en regiones de código de barras de ADN permitió establecer la huella molecular de las especies analizadas y proporcionar información valiosa para su identificación taxonómica precisa.

## Referencias bibliográficas

- Aboul, M., Aboul, N., & Abdel- Sadek, H. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(25), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Alvarado, L., Flores, D., Chacón, R., Schmidt, A., & Alvarado, C. (2015). Caracterización molecular de dos accesiones de *Cydonia oblonga*. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2), 351-354. <https://doi.org/10.15517/am.v26i2.19329>



- Arnelas, I., Invernón, V., González, M. de la E., López, E., & Devesa, J. (2012). Manual de laboratorio de Botánica. El herbario. Recolección, procesamiento e identificación de plantas vasculares. *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 5(2), 15-24. <http://sweetgum.nybg.org/ih>
- Baranow, P., Szlachetko, D., & Kindlmann, P. (2023). Taxonomic revision of *Sobralia* section *Racemosae* Brieger (Sobralieae, Orchidaceae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1-27. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1058334>
- Callatasig, M., & Miranda, R. (2023). *Revisión del Género Bomarea del Ecuador mediante información molecular a través del sistema BARCODE*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/25309/1/TTQ1132.pdf>
- Carrión Jiménez, M. del C. (2009). *Identificación de orquídeas Epifitas del Ecuador mediante DNA barcoding*. [https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificación de Orquídeas Epifitas del Ecuador mediante DNA.pdf](https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificación%20de%20Orquídeas%20Epifitas%20del%20Ecuador%20mediante%20DNA.pdf)
- Chimsook, T. (2016). Phytochemical Screening, Total Phenolic Content, Antioxidant Activities and Cytotoxicity of *Dendrobium signatum* Leaves. *Matec web de conferencias*, 1-6. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20166203005>
- Clavijo, N., & Cruz, B. (2017). Análisis Fitoquímico Preliminar de *Pachira quinata* (Jacq.) W.S. Alverson, Bogotá, Colombia. *Boletín Semillas Ambientales*, 11(1), 30-39. <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/bsa/article/view/12230/12767>
- Coronado, E. (2020). *Diseño de una guía turística para la incorporación de las orquídeas nativas como un elemento atractivo en sitios de interés turístico en el cantón de Pastaza* [Estatal Amazónica]. <https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/751/1/T.TUR.B.UEA.4171.pdf>
- Downie, S., Katz, D., & Cho, K. J. (1996). Phylogenetic Analysis of Apiaceae Subfamily Apioideae Using Nucleotide Sequences from the Chloroplast rpoC1 intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(1), 1-18. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0053>
- Endara, A., & Ocaña, M. (2022). *Análisis molecular de las especies del Ecuador del género Restrepia (orchidaceae) y análisis filogenético de secuencias obtenidas de genbank*.
- Fernández, D., Tobar, F., Garzón, C., Yáñez, M., Mena, J., & González, D. (2018). *Orquídeas y Bromelias de la provincia de el Oro*. Gobierno Autónomo descentralizado de la provincia de EL Oro. [http://inabio.biodiversidad.gob.ec/wp-content/uploads/2019/02/Qrquideas\\_y\\_bromelias\\_de\\_el\\_Oro\\_Guia.pdf](http://inabio.biodiversidad.gob.ec/wp-content/uploads/2019/02/Qrquideas_y_bromelias_de_el_Oro_Guia.pdf)
- Gallardo, M., Trujillo, G., Jaramillo, R., & Rodríguez, J. (2021). Ecuador genera propuesta para el fortalecimiento de la cadena de valor de orquídeas en la región amazónica (Napo, Morona Santiago y Zamora Chinchipe). *Serie Artículos Técnicos OTCA*, 7, 1-12. [http://otca.org/wp-content/uploads/2021/02/ARTICULO\\_TECNICO\\_Ecuador-genera-propuesta-para-la-cadena-de-valor-de-orquideas\\_EC.pdf](http://otca.org/wp-content/uploads/2021/02/ARTICULO_TECNICO_Ecuador-genera-propuesta-para-la-cadena-de-valor-de-orquideas_EC.pdf)
- Gallego, M. (2016). Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles. En *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/403986>
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Universidad Politécnica de Valencia*, 1-9. <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>
- Hinsley, A., De Boer, H., Fay, M., Gale, S., Gardiner, L., Gunasekara, R., Kumar, P., Masters, S., Metusala, D., Roberts, D., Veldman, S., Wong, S., & Phelps, J. (2018). A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186, 435-455. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box083>
- Hossain, M. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - An overview. *Fitoterapia*, 82, 102-140. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>
- Huyen, T., Vu, T., Le, T. L., Nguyen, T. K., & Tran, D. D. (2017). Review on molecular markers for identification of orchids. *Life Sciences*, 59(2), 62-75.
- invitrogen. (2019, septiembre 9). *Platinum Direct PCR universal Master Mix*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>

- Iza, M. (2018a). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO DRACULA, MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE. En *Tesis*. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Iza, M. (2018b). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO DRACULA, MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE. En *Tesis*.
- Kumar, A., & Singh, L. (2023). Ethnomedicinal uses of Orchids and its Species under Threat: A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(9), 4469-4478. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2023.00729>
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Scielo*, 25(4), 726-732. <https://www.scielo.br/j/cta/a/B58T9S5zLLxjBL5PVzZXHCF/>
- Lee, K. H., Kwon, K.-R., Kang, W.-M., Jeon, E.-M., & Jang, J.-H. (2012). Identification and Analysis of the Chloroplast rpocl gene differentially expressed in wild ginseng. En *Journal of Pharmacopuncture* (Vol. 15, Número 2). <https://doi.org/10.3831/kpi.2013.16.002>
- Li, H., Xiao, W., Li, Y., Zhang, M., Lin, X., Zou, X., Wu, Q., & Guo, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *scientific reports*, 11, 1-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-81087-w>
- López, A., Barragán, G., Lagunez, L., & Aniceto, R. (2016). Capacidad antioxidante y perfil fitoquímico de dos especies de orquídeas mexicanas. *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*, 4(1), 605-610. [https://www.researchgate.net/publication/338826530\\_Capacidad\\_antioxidante\\_y\\_perfil\\_fitoquimico\\_de\\_dos\\_especies\\_de\\_orquideas\\_mexicanas](https://www.researchgate.net/publication/338826530_Capacidad_antioxidante_y_perfil_fitoquimico_de_dos_especies_de_orquideas_mexicanas)
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J., Kim, S. C., & Gómez, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2), 127-138. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Menchaca, R. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. En *Comisión Nacional Forestal* (Primera, pp. 1-56). [http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL\\_PARA\\_LA\\_PROPAGACION\\_DE\\_ORQUIDEAS.PDF](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF)
- Mencias, H., & Salazar, T. (2018). ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DE LOS GÉNEROS EPIDENDRUM, ONCIDIUM Y CAUCAEA. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15932/1/UPS-QT13094.pdf>
- Minh, T. N., Khang, D. T., Tuyen, P. T., Minh, L. T., Anh, L. H., Van Quan, N., Ha, P. T. T., Quan, N. T., Toan, N. P., Elzaawely, A. A., & Xuan, T. D. (2016). Phenolic compounds and antioxidant activity of phalaenopsis orchid hybrids. *Antioxidants*, 5(3), 1-12. <https://doi.org/10.3390/antiox5030031>
- Miño, J. (2018). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO PASSIFLORA (PASSIFLORACEAE), DE LA REGIÓN NORTE DEL ECUADOR POR MEDIO DEL MÉTODO DNA BARCODING. En *Tesis*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16148>
- Mogrovejo, A., & Proaño, Y. (2020). FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Gongora* ORCHIDACEAE, DE LAS ESPECIES REGISTRADAS EN EL ECUADOR. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18438>
- Molina, L. (2020). 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". <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18989>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Montalvo, M., & Vargas, L. (2019). REVISIÓN DE LAS ESPECIES LATINOAMERICANAS DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO DRACULA MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR BARCODE. En *Tesis*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16978/1/UPS-QT13818.pdf>



- Muñoz, M., & Gutiérrez, D. (2004). Determinación De Actividad Antioxidante De Diversas Partes Del Arbol Nicotiana Glauca. *Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219. <https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/7VeranoUAQ/14MunozJuarez.pdf>
- Naviglio, D., Trifuoggi, M., Varchetta, F., Nebbioso, V., Perrone, A., Avolio, L., De Martino, E., Montesano, D., & Gallo, M. (2023). Efficiency of Recovery of the Bioactive Principles of Plants by Comparison between Solid-Liquid Extraction in Mixture and Single-Vegetable Matrices via Maceration and RSLDE. *Plants*, 12, 1-18. <https://doi.org/10.3390/plants12162900>
- Nguyen, H. C., Lin, K. H., Huang, M. Y., Yang, C. M., Shih, T. H., Hsiung, T. C., Lin, Y. C., & Tsao, F. C. (2018). Antioxidant activities of the methanol extracts of various parts of Phalaenopsis orchids with white, yellow, and purple flowers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 457-465. <https://doi.org/10.15835/nbha46211038>
- Noriega, P., Sola, M., Barukcic, A., Garcia, K., & Osorio, E. (2015). Cosmetic Antioxidant Potential of Extracts from Species of the Cinchona Pubescens (Vahl). *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2015.14>
- Ocaña, E., & Valencia, S. (2023). Identificación de Subespecies de orquídeas pertenecientes al grupo de *Epidendrum Nocturnum* (Orchidaceae), mediante la técnica molecular DNA Barcode. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/24295/1/TTQ1020.pdf>
- Osorio, E. (2009). *Aspectos Básicos de la Farmacognosia*.
- 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>
- Paudel, M. R., Chand, M. B., Karki, N., & Pant, B. (2015). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of Dendrobium amoenum Wall. ex Lindl. *Botanica Orientalis: Journal of Plant Science*, 9, 20-26. <https://doi.org/10.3126/botor.v9i0.21010>
- Phan, N., Nguyen, T. P., Phan, H. N., Do, T. D., Do, G. D., Ngo, L. H., Dang, H., Do, D. K., & Nguyen, K. T. (2023). Polysaccharide and ethanol extracts of Anoectochilus formosanus Hayata: Antioxidant, wound-healing, antibacterial, and cytotoxic activities. *Heliyon*, 9(3), 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13559>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Quinchuela, C. D. B., & Vaca, E. I. A. (2020). Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género Huntleya (Orchidaceae) del Ecuador. En *Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18435>
- Ramya, M., Jang, S., An, H. R., Lee, S. Y., Park, P. M., & Park, P. H. (2020). Volatile organic compounds from orchids: From synthesis and function to gene regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms21031160>
- Randriamiharisoa, M., Kuhlman, A., Jeannoda, V., Rabarison, H., Rakotoarivelo, N., Randrianarivony, T., Raktoarivony, F., Randrianasolo, A., & Busmann, R. (2015). Medicinal plants sold in the markets of Antananarivo, Madagascar. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13002-015-0046-y>
- RitaAle, B. B. R. (2021). Códigos de orquídeas medicinales en. *Nature portfolio*, 11, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-03025-0>
- Rojas, M., & Silva, E. (2023). Análisis molecular del género Gongora (Orchidaceae), mediante el gen *matk*, *rpoc1* y *yfcl* de las especies registradas en el ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/24296>
- Rudall, P., & Bateman, R. (2002). Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. *Biol.Rev*, 77, 403-441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1464793102005936>



- Ruiz, A. (2020). Germinación asimbiótica in vitro de *Sobralia macrantha* Lindl. una orquídea terrestre. En *Unam*. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000804010/3/0804010.pdf>
- Ruiz Betancourt, A. (2020). Germinación asimbiótica in vitro de *Sobralia macrantha* Lindl. una orquídea terrestre. En *Unam*.
- Rykaczewski, M., Krauze-Baranowska, M., Żuchowski, J., Krychowiak-Maśnicka, M., Fikowicz-Krośko, J., & Królicka, A. (2019). Phytochemical analysis of *Brasolia*, *Elleanthus*, and *Sobralia*. Three genera of orchids with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus*. *ELSEVIER*, *30*, 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.008>
- Singh, A., & Duggal, S. (2009). Medicinal Orchids - An Overview. *Ethnobotanical Leaflets*, *13*, 399-412. <http://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1411&context=ebl>
- Solis, H. (2023). *Estudio del gen APETALA 2 como marcador molecular para identificación de especies de la familia Orchidaceae en los géneros Gongora, restrepia, epidendrum*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/25310/1/TTQ1133.pdf>
- Surag, M. T., Begum, R., Tusher, S. H., & Huda, M. K. (2022). Propiedades fitoquímicas, antiinflamatorias y trombolíticas de *Cleisomeria lanatum* <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2022/5660527>  
Artículo
- Suta, S., Filippo, M., & Dall'Acqua, S. (2017). Bioactive Secondary Metabolites from Orchids (Orchidaceae). *Chemistry and Biodiversity*, *14*, 1-14. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700172>
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., & Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, *163*, 547-561. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x>
- Teoh, E. S. (2016). *Medicinal orchids of Asia*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3>
- The Plant List. (2013). *Orchidaceae*. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>
- Yáñez, L. (2022). *Compuestos Fenólicos en plantas del Ecuador, revisión de propiedades y beneficios medicinales*. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c2bb8701-3a68-4737-9fc2-e8c1e05cfe5c/content>
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, *40*(4), 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>

**Conflicto de intereses:**

Los autores declaran que no existe conflicto de interés posible.

**Financiamiento:**

No existió asistencia financiera de partes externas al presente artículo.

**Agradecimiento:**

N/A

**Nota:**

El artículo no es producto de una publicación anterior.



## Anexos

