



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZONA HUASTECA



**Estudio de la conservación, producción y efectos medicinales de
Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

BQ. Alejandra Morales López

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Candy Carranza Álvarez

CODIRECTORA DE TESIS:

Dra. Abigail Reyes Munguía

ASESOR:

Dr. Ángel Josabad Alonso Castro

Cd. Valles, S.L.P.

Julio, 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZONA HUASTECA



Estudio de la conservación, producción y efectos medicinales de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews

BQ. ALEJANDRA MORALES LÓPEZ



Estudio de la conservación, producción y efecto medicinales de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews © 2025 de Alejandra Morales López tiene licencia CC BY-NC-ND 4.0. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Cd. Valles, S.L.P.

Julio, 2025

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El programa de Maestría Ciencias Bioquímicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrado (SNP) de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), Registro 006289.



Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

El presente trabajo fue realizado con apoyo de una beca académica de Nivel de Maestría, otorgada por SECIHTI con el número 804803.

A Dios.

Ya mi madre que siempre ha sido mi inspiración y motor de vida para salir a delante, que gracias a todo su esfuerzo y apoyo he podido cumplir mis más grandes sueños.

Te amo mamá.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, especialmente a la Maestría en Ciencias Bioquímicas, al Laboratorio de Tecnología de los Alimentos, al Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales, y al Departamento de Farmacia en la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato (UG), por permitirme realizar la parte experimental de esta investigación.

A la Dra. Candy Carranza Álvarez, directora de esta investigación, responsable del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales, por guiarme, por todos sus consejos, y sobre todo por todo el apoyo que me ha brindado, personal, académica y laboralmente. Dios la bendiga siempre.

A la Dra. Abigail Reyes Munguía, codirector de esta investigación, por asesorarme en esta investigación y apoyo durante la maestría.

Al Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, Asesor de esta investigación, por recibirme en su laboratorio, y estar pendiente de la resolución de mis dudas.

Al M.C. David Guadalupe Cruz Torres, gracias por siempre ser mi apoyo en todo momento y por alentarme a siempre seguir adelante. Te amo.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales principalmente al Dr. Luis Jesús Castillo Pérez, M.C. Amauri Ponce Hernández y BQ. Daniel Torres Rico, por su apoyo y por hacer más divertida mi estancia en el laboratorio.

A mi familia por siempre apoyarme y animarme en todo momento, especialmente a Jorge Galván y a mis abuelitos.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Generalidades de las orquídeas	4
2.2. Orquídeas de México	6
2.3. Importancia de la Vanilla en México.....	7
2.4. Descripción de <i>Vanilla planifolia</i>	8
2.5. Cultivo de tejidos vegetales	10
2.6. Micropropagación <i>in vitro</i>	12
2.7. Biorreactores de inmersión temporal	15
2.8. Medicina tradicional	18
2.9. Usos medicinales de las orquídeas.....	19
2.10. Vainilla medicinal	21
2.11. Capacidad Antioxidante	23
2.11.1. Compuestos fenólicos.....	24
2.11.2. Flavonoides	26
2.12. Dolor	26
2.12.1. Clasificación del dolor	27
2.12.2. Fisiología del dolor	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31

3.1. Obtención del material vegetal.....	31
3.1.1. Preparación de medio de cultivo.....	31
3.2. Colocación de Sistema de Biorreactores de inmersión temporal.....	31
3.3. Estandarización de tiempos de inmersión en Sistema de Biorreactores de inmersión temporal.....	31
3.4. Tratamientos con reguladores de crecimiento	32
3.5. Elaboración de extracto etanólico de hojas de <i>V. planifolia</i> y plantulas provenientes de Biorreactores	33
3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante	34
3.6.1. Método ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo- tiazolina-6-acido sulfónico).....	34
3.6.2. Método DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil)	36
3.6.3. Polifenoles totales.....	37
3.6.4. Flavonoides	38
3.7. Concentración inhibitoria media (CI_{50})	39
3.8. Prueba de retorcimiento inducido por ácido acético en ratones BALB-C....	40
3.9. Prueba de formalina.....	40
3.10. Dosis Efectiva media (DE_{50}).....	40
3.11. Análisis estadístico.....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Propagación de <i>V. planifolia</i> en Biorreactores de Inmersión temporal.....	42
4.2. Cuantificación de la Capacidad Antioxidante	62
4.2.1. Capacidad Antioxidante del extracto de <i>V. planifolia</i> al inhibir el radical DPPH•	62
4.2.2. Capacidad antioxidante del extracto de <i>V. planifolia</i> al inhibir el radical ABTS•+	65

4.2.3. Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extracto de <i>V. planifolia</i>	68
4.3. Efecto antinociceptivo del extracto de <i>V. planifolia</i>	71
4.3.1. Prueba de contorsiones inducidas por ácido acético	71
4.3.2. Prueba de formalina.....	74
V. CONCLUSIONES	78
VI. PESPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	80
VII. REFERENCIAS	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secciones vegetales de <i>V. planifolia</i>	9
Figura 2. Obtención de una planta nueva a partir de una sección vegetal en la técnica de cultivo de tejidos vegetales.	11
Figura 3. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i>	13
Figura 4. Fundamento del funcionamiento de un Sistema de Inmersión Temporal (SIT).	17
Figura 5. Esquema que muestra las rutas de biosíntesis de diferentes grupos de taninos y otros compuestos fenólicos.....	26
Figura 6. Curva de calibración de ácido ascórbico los 60 minutos para el método ABTS•+.....	35
Figura 7. Curva de calibración con ácido ascórbico a los 30 minutos para el método DPPH•.....	36
Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de Polifenoles totales.....	38
Figura 9. Curva de calibración de catequina para determinación de flavonoides.	39
Figura 10. Evaluación de frecuencia de inmersión en vitroplantas de <i>V. planifolia</i>	43
Figura 11. Evaluación de altura y altura de brotes sobre el T1.	46
Figura 12. Plántulas de <i>V. planifolia</i> en biorreactor de inmersión temporal.....	47
Figura 13. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T1.....	49
Figura 14. Evaluación de altura y altura de brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T2.	51
Figura 15. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T2.....	52
Figura 16. Evaluación de altura y altura de brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T3.	55
Figura 17. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T3.....	56

Figura 18. Evaluación de altura y altura de brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T4	58
Figura 19. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de <i>V. planifolia</i> sobre el T4	61
Figura 20. Porcentaje de inhibición de radical DPPH• y Concentración equivalente a ácido ascórbico en extractos de <i>V. planifolia</i>	63
Figura 21. Porcentaje de inhibición de radical ABTS•+ y Concentración equivalente a ácido ascórbico en extractos de <i>V. planifolia</i>	66
Figura 22. Concentración equivalente a ácido gálico y miligramos equivalentes a catequina en extractos de <i>V. planifolia</i>	69
Figura 23. Efecto antinociceptivo del extracto de <i>V. planifolia</i> de hojas silvestres en la prueba de contracciones inducidas por ácido acético	72
Figura 24. Curva dosis-respuesta DE ₅₀ para el efecto antinociceptivo prueba de ácido acético del extracto de <i>V. planifolia</i>	73
Figura 25. Efecto antinociceptivo de extracto de <i>V. planifolia</i> de hojas silvestres en la prueba de formalina.....	75
Figura 26. Curva dosis-respuesta DE ₅₀ para el efecto antinociceptivo prueba de formalina del extracto de <i>V. planifolia</i>	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>V. planifolia</i>	9
Tabla 2. Especies de la familia Orchideaceae con efectos medicinales estudiados científicamente.	19
Tabla 3. Secciones de <i>V. planifolia</i> más utilizadas para uso medicinal.....	22
Tabla 4. Tiempos de Inmersión utilizados en los Biorreactores de Inmersión Temporal.	32
Tabla 5. Tratamientos con reguladores de crecimiento implementados en biorreactores de inmersión temporal	32
Tabla 6. Rampa de temperaturas para elaboración del extracto etanólico de <i>V. planifolia</i>	34
Tabla 7. CI ₅₀ de extractos de <i>V. planifolia</i>	65

RESUMEN

En este estudio se estableció la propagación *in vitro* de *Vanilla planifolia* utilizando el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT), con el objetivo de obtener una mayor producción de biomasa en menos tiempo, en comparación con el sistema tradicional de medio semisólido. Se evaluó la frecuencia de inmersión realizando pruebas de 2 minutos cada 4, 8 y 12 horas, midiendo la altura de las plántulas y los brotes de *V. planifolia*. Los resultados mostraron que la frecuencia óptima era de 2 minutos cada 4 horas. Posteriormente, se implementó el sistema de inmersión temporal con esa frecuencia, utilizando plántulas de *V. planifolia* provenientes del sistema semisólido y combinaciones de hormonas vegetales para incrementar la eficacia de la reproducción. El mejor tratamiento fue el Tratamiento 1 (T1), que contenía 3 ppm de BAP (6-bencilaminopurina), 1.5 ppm de AIA (ácido indol acético) y 150 mg/L de AA (ácido ascórbico), obteniendo plántulas con una altura promedio de 1.22 ± 0.05 cm, una altura de brotes de 1.48 ± 0.04 cm, con 7.66 ± 0.88 hojas, 7.33 ± 0.66 raíces y 8.66 ± 0.33 brotes. Una vez obtenida la biomasa suficiente, se realizaron extractos etanólicos a una concentración de 10 mg/L de las vitroplantas provenientes del sistema de biorreactor (EVPPB) y de hojas silvestres secas de *V. planifolia* (EVPHS). Se cuantificó la actividad antioxidante mediante la inhibición de los radicales libres DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS•⁺ (2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico), los resultados mostraron que el EVPHS, tenía un porcentaje de inhibición al radical DPPH• mayor con 65.74 ± 0.18 % con 67.07 ± 1.90 mg de VCEAC/ gr (actividad antioxidante equivalente a Vitamina C) y una inhibición de ABTS•⁺ de 90.76 ± 2.31 % con 93.16 ± 1.37 mg VCEAC/gr a comparación de EVPPB con porcentaje de inhibición del radical DPPH• de 50.56 ± 1.13 % con 43.06 ± 1.18 mg de VCEAC/ g y una inhibición de ABTS•⁺ de 69.05 ± 0.95 % con 63.11 ± 2.3 VCEAC/gr. Asimismo, se cuantifico la cantidad de polifenoles y flavonoides cuantificando para el EVPHS de 75.09 ± 3.38 mg EAG/ 100 g (equivalentes de ácido gálico) y 67.36 ± 5.61 mEq CAT/ g (miliequivalentes de catequina) y para EVPPB 52.76 ± 1.73 mg EAG/ 100 g y 33.26 ± 1.62 mEq CAT/g. Por último, se evaluó la actividad antinociceptiva de EVPHS mediante la

prueba de contorsiones inducidas por ácido acético, un ensayo que mide el dolor visceral inespecífico. Se utilizaron dosis del extracto de 10, 100 y 200 mg/kg, encontrándose que la dosis más efectiva fue la de 200 mg/kg, con 11.43 ± 2.72 contorsiones y con una dosis efectiva 50 (DE₅₀) de 72.62 mg/kg. Además, se realizó la prueba de formalina, que evalúa el dolor central y periférico en dos fases. En la fase 1, la dosis de 200 mg/kg resultó en 61.33 ± 12.10 segundos de dolor comparado con los 77.17 ± 5.19 segundos del grupo control. En la fase 2, la dosis de 200 mg/kg produjo 62.83 ± 9.86 segundos de dolor con una DE₅₀ de 11.06 mg/kg, mientras que el grupo control tuvo 225 ± 12.45 segundos. Estos resultados indican que el extracto posee actividad antinociceptiva en el dolor provocado por inflamación.

Palabras clave: *vainilla, biorreactor, antioxidantes, actividad antinociceptiva.*

ABSTRACT

In this study, the *in vitro* propagation of *Vanilla planifolia* was made using the temporary immersion bioreactor system (TBI), with the aim of obtaining greater biomass production in less time, compared to the traditional semi-solid medium system. The frequency of immersion was evaluated by performing 2-minute tests every 4, 8 and 12 hours, measuring the height of *V. planifolia* seedlings and shoots. The results showed that the optimal frequency was 2 minutes every 4 hours. Subsequently, the temporary immersion system was implemented with that frequency, using *V. planifolia* seedlings from the semi-solid system and combinations of plant hormones to increase the efficiency of reproduction. The best treatment was Treatment 1 (T1), which contained 3 ppm of BAP (Benzylaminopurine), 1.5 ppm of IAA (Indoleacetic acid) and 150 mg/L of AA (Ascorbic acid), obtaining seedlings with an average height of 1.22 ± 0.05 cm, a shoot height of 1.48 ± 0.04 cm, with 7.66 ± 0.88 leaves, 7.33 ± 0.66 roots and 8.66 ± 0.33 shoots. Once sufficient biomass was obtained, ethanolic extracts were made at a concentration of 10 mg/L from the vitroplants from the bioreactor system (EVPPB) and from dried wild leaves of *V. planifolia* (EVPHS). The antioxidant activity was quantified by inhibiting the free radicals DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS•+ (2, 2'-Azinobis-3-ethyl- benzo-thiazoline-6-sulfonic acid), the results showed that EVPHS had a higher percentage of inhibition of the DPPH• radical with 65.74 ± 0.18 % with 67.07 ± 1.90 mg of VCEAC/g (Antioxidant activity equivalent to Vitamin C) and an inhibition of ABTS•+ of 90.76 ± 2.31 % with 93.16 ± 1.37 mg VCEAC/g compared to EVPPB with a percentage of inhibition of the DPPH• radical of 50.56 ± 1.13 % with 43.06 ± 1.18 mg of VCEAC/g and an inhibition of ABTS •+ 69.05 ± 0.95 % with 63.11 ± 2.3 VCEAC/gr. Likewise, the amount of polyphenols and flavonoids was quantified, quantifying for the EVPHS 75.09 ± 3.38 mg EAG/ 100 g and 67.36 ± 5.61 mEq CAT/ g and for EVPPB 52.76 ± 1.73 mg EAG/ 100 g (Gallic acid equivalents) and 33.26 ± 1.62 mEq CAT/g (Catechin). Finally, the antinociceptive activity of EVPHS was assessed using the acetic acid-induced writhing test, an assay that measures nonspecific visceral pain. Doses of the extract

of 10, 100 and 200 mg/kg were used, finding that the most effective dose was 200 mg/kg, with 11.43 ± 2.72 contortions with an ED_{50} of 72.62 mg/kg. Additionally, the formalin test was performed, which evaluates central and peripheral pain in two phases. In phase 1, the 200 mg/kg dose resulted in 61.33 ± 12.10 seconds of pain compared to 77.17 ± 5.19 seconds in the control group. In phase 2, the 200 mg/kg dose produced 62.83 ± 9.86 seconds of pain with an ED_{50} of 11.06 mg/kg, while the control group had 225 ± 12.45 seconds. These results indicate that the extract has antinociceptive activity in pain caused by inflammation.

Keywords: *vanilla, bioreactor, antioxidants, antinociceptive activity.*

I. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las familias vegetales más importantes altamente evolucionadas que cuenta con más de 800 géneros y más de 30,000 especies distribuidas en todo el mundo. Existen más de 100 especies de este género, en todos los continentes, y una gran parte se encuentra en América tropical (Dressler, 2005; Hágsater *et al.*, 2015; Willis, 2017). *V. planifolia* es una orquídea originaria de México y a pesar de que hay muchas más variedades esta es la única que se cultiva a pesar de estar en categoría Sujeta A Protección según la NOM-059- SEMARNAT-2010, siendo el sustento de productores mexicanos en el año 2021 se produjeron en Veracruz 465.38 toneladas, en Puebla 74.06 toneladas, en Oaxaca 61.53 toneladas y en San Luis Potosí 8.6 toneladas (Luna-Guevara *et al.*, 2016; SIAP, 2021). En el estado de San Luis Potosí, los municipios productores de vainilla se ubican en la región Huasteca y son: Axtla de Terrazas, Tamazunchale, Aquismón, Matlapa, Coxcatlán, Huehuetlán y Xilitla (Vargas-Hernández, 2014). *V. planifolia* es una de las orquídeas de mayor importancia a nivel mundial, debido a que su fruto se utiliza como saborizante y aromatizante en la industria y es la única especie dentro del género Orchidaceae con frutos comestibles (Bory *et al.*, 2008; González-Arno *et al.*, 2009; Soto-Arenas y Dresser, 2010), aunque se ha comprobado que vainilla no solo es aprovechada por sus frutos comestibles, sino también por las propiedades medicinales que poseen sus vainas, sin embargo, otras secciones vegetales como las hojas y los tallos de no han sido estudiadas. La planta de vainilla presenta problemas para su conservación debido a la amenaza constante a su hábitat natural y a la baja tasa de germinación como el resto de las orquídeas, por esta razón el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos *in vitro* es una técnica eficaz para multiplicar de manera masiva *V. planifolia* (Carranza-Álvarez *et al.*, 2020). El cultivo de tejidos vegetales (CTV) involucra diversas técnicas de cultivo de tejidos y órganos celulares, el cual consiste en regenerar plantas a partir de secciones cultivadas en medios de cultivo con los nutrientes necesarios y específicos de manera aséptica y bajo condiciones controladas de luz y temperatura (Sharry *et al.*, 2015). Una de las herramientas del CTV es la

micropropagación y una de las formas más eficaces de hacerlo es por medio de biorreactores de inmersión temporal (BIT), los cuales consisten en un sistema automatizado que se utiliza para cultivar tejidos vegetales en condiciones estandarizadas, excluyendo la contaminación microbiana. Este tipo de sistema optimiza el cultivo de plantas a través de la automatización de procesos y permite la ganancia y acorta propagación biomasa-tiempo (Máximo *et al.*, 2018), además de mejorar el suministro de nutrientes y los procesos de transferencia de gases, así como de minimizar las alteraciones fisiológicas en las plantas, mejorando así el desarrollo de cultivos micropropagados (Cajina Silva, 2023). El uso de inmersión temporal con medio de cultivo líquido mejora la eficiencia de la micropropagación en comparación con el método convencional en medio semisólido. La producción de vainilla a gran escala obtiene un mayor número de plantas en menor tiempo lo que permite contar con material vegetal para estudiar las propiedades medicinales de *V. planifolia* y así poder contar con una alternativa biotecnológica de producción para no afectar las poblaciones de plantas silvestres. Por ello, el objetivo de la presente investigación es estandarizar las condiciones de cultivo de *V. planifolia* en sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT) y evaluar las propiedades antioxidantes y etnofarmacológicas de *V. planifolia* para darle un valor agregado a este cultivo.

1.1. Objetivo General

Estandarizar las condiciones de cultivo de *V. planifolia* en sistemas de inmersión temporal y evaluar las propiedades de un extracto etanólico de hojas para darle un valor agregado a este cultivo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de multiplicación *in vitro* de *V. planifolia* en Biorreactores de Inmersión temporal.
- Determinar la presencia de antioxidantes de un extracto etanólico de vitroplantas y hojas de plantas silvestres de *V. planifolia*.
- Evaluar el efecto antinociceptivo del extracto etanólico de hojas de *V. planifolia* en modelos murinos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de las orquídeas

La familia Orchideaceae es la segunda familia más grande de plantas con flores, comprenden de 700-880 géneros y más de 30,000 especies en el mundo y es una de las más grandes de las monocotiledóneas. La distribución de las orquídeas abarca todos los continentes excepto la Antártida. En la distribución de las orquídeas 70 % son epifitas y el resto corresponde a terrestres y rupícolas a (Dressler, 2005; Hágsater *et al.*, 2015).

Las orquídeas son plantas de larga vida, de hoja perenne, algunas orquídeas como *Cypripedium calceolus* llegan a vivir hasta 100 años (Kull, 1999). El crecimiento de las orquídeas consiste en dos patrones, monopodiales y simpodiales. Las monopodiales crecen a partir de un solo punto (de un tallo) y produciendo hojas del ápice cada año, por otro lado, las orquídeas simpodiales se desarrollan como pseudobulbos, crecen hacia los lados, en lo que los brotes terminales que florecen y finalmente mueren (Arditti, 2008; Sailo *et al.*, 2014). Aunque no todas las orquídeas crecen de la misma manera, por lo que existen diferentes tipos de orquídeas, cada una con sus características y rasgos distintivos en las que se encuentran:

Orquídeas epifitas: Las orquídeas epifitas utilizan como soporte físico a los árboles (forofito) para geminar, crecer y reproducirse sin establecer contacto con el suelo en ninguna etapa de su ciclo de vida (Zotz, 2016). Estas orquídeas se adaptan a los cambios morfológicos del forofito, aclimatándose y aumentando su longevidad típica. Aunque las orquídeas epifitas no son dependientes de su forofito, su estrecha relación contribuye a su conservación, debido a que al estar en este son protegidas por depredadores y obtienen materia orgánica que se acumula en la corteza de los árboles, además, su ciclo de vida depende de otros organismos como polinizadores y hongos simbióticos (Rasmussen y Rasmussen, 2018).

Orquídeas terrestres: Las orquídeas terrestres son conocidas por su especificidad de especies en relación con polinizadores y especies micorrízicas, son diferentes a las demás orquídeas y como su nombre lo indica, se reproducen directamente en el suelo, por lo que establecen una relación con un hongo micorrízico, denominado micorriza de orquídeas, donde la orquídea utiliza el hongo para la obtención de carbono a cambio de una nutrición mineral (Shefferson *et al.*, 2019) Las orquídeas dependen exclusivamente de su asociado micorrízico durante la fase de protocormo (Gebauer *et al.*, 2016).

Orquídeas litofitas o rupícolas: Son orquídeas que se encuentran establecidas en rocas, su mecanismo de vida es la absorción de humedad del ambiente por medio de las raíces además del establecimiento de asociaciones con muscos y líquenes para obtener materia orgánica para la obtención de nutrientes (Gavendeel *et al.*, 2004; Bellone, 2006).

Las orquídeas a lo largo de su vida establecen diferentes tipos de interacciones con el propósito de sobrevivir:

Orquídea-Forofito: Ocurre en orquídeas epifitas ya que estas viven adheridas a los árboles huésped por medio de su morfología, acumulando agua en las hojas, en sus tallos modificados a pseudobulbos y por medio de las raíces (Gutiérrez Novoa, 2021). Además, en algunas ocasiones las orquídeas necesitan penetrar la corteza de los árboles y fijarse para establecerse, tomando en cuenta factores como el pH del árbol, luz y humedad (Pozo y Trabanco, 2015; Novoa, 2020).

Orquídea-Polinizador: Los polinizadores han sido de gran importancia ya que han contribuido con la diversificación de las orquídeas y son de gran importancia para su conservación. Las orquídeas utilizan diversas estrategias de polinización e interactúan con diferentes tipos de polinizadores como aves, palomillas, mariposas, avispa y una gran variedad de abejas (Shrestha *et al.*, 2020). En esta interacción mutuamente beneficiosa, algunos polinizadores obtienen recompensas de las flores y la planta obtiene la fecundación de las flores (Trejo-Salazar *et al.*, 2015, Joffard *et*

al., 2019), en otros casos las orquídeas no ofrecen ningún beneficio a los polinizadores ya que los atraen utilizando señales que los polinizadores suelen asociar con una promesa alimentaria o sexual (Jersáková *et al.*, 2006).

Orquídea-Micorriza: Una de las interacciones ecológicas más importantes de las orquídeas es la interacción con los hongos, ya que las orquídeas forman redes micorrícicas complejas que permiten la transferencia de nutrientes del suelo, sin embargo, este tipo de hongos también se encuentran en la corteza de los árboles y crean simbiosis con orquídeas epífitas (Petrolli *et al.*, 2022). La interacción de los hongos con las orquídeas forma estructuras intracelulares denominadas pelotones ya que requieren la presencia de las micorrizas en sus diferentes etapas de vida desde la germinación hasta la vida adulta (Ramussen, 1995; Smith y Read, 2008), los principales grupos de hongos micorrícicos de orquídeas son Basidiomycota y Ascomycetes (Wang *et al.*, 2021; Selosse *et al.*, 2022).

2.2. Orquídeas de México

En México existe un aproximado de 260 especies y 170 géneros, donde el 40 % son orquídeas endémicas (Hágsater *et al.*, 2015). El país es considerado a nivel mundial por su gran diversidad biológica, debido a sus condiciones fisiográficas, geológicas y climáticas, lo que da como resultado una amplia variedad de condiciones naturales y microambientes adecuados para el crecimiento de especies de la familia Orchideaceae (Bastida-Tapia *et al.*, 2017). En México, la mayor diversidad de orquídeas se encuentra en los bosques tropicales, donde crecen en un 60 % como epífitas (Hágsater *et al.*, 2015, Givnish *et al.*, 2015).

Castillo-Pérez *et al.* (2018), mencionaron que la mayoría de las orquídeas del país se encuentra en el sur y en el oeste de México en los estados de Oaxaca, Chiapas y Jalisco y la menor cantidad de orquídeas se encuentran en el norte como Coahuila y Tamaulipas y en el centro de México como zacatecas y San Luis Potosí.

En las comunidades indígenas y mestizas del país, uso de plantas medicinales se ha preservado de generación en generación y ha sido muy importante en la cultura de estas comunidades. Muchas de las tradiciones surgieron en los rituales y ceremonias de civilizaciones precolombinas (Pardo de Santayana y Gómez Pellón, 2002). En el caso de las orquídeas no solo son utilizadas de manera ornamental; las comunidades indígenas y mestizas que han preservado las tradiciones de antepasados han utilizado sus flores y tallos con fines artesanales, ceremoniales y culturales, los géneros más utilizados con este fin son *Laelia*, *Barkeria*, *Oncidium*, *Prosthechea* y *Rhynchosste* en los estados de Oaxaca, Veracruz y Chiapas (Mencias Méndez y Salazar Ponce, 2018). Otro uso que se le ha atribuido a las orquídeas en México es uso etnobotánico, ya sea por conocimiento empírico o transferido de generación en generación (Emeterio-Lara *et al.*, 2016).

Actualmente las orquídeas mexicanas están en riesgo, debido a la deforestación, la conversión de tierras a la agricultura o la ganadería, el saqueo de las orquídeas de su hábitat natural para su comercio ilícito (Hinsley *et al.*, 2015; Hinsley *et al.*, 2017). Es común que las orquídeas sean comercializadas en mercados locales por la belleza y rareza de sus exuberantes inflorescencias (Cruz-García *et al.*, 2015, Emeterio-Lara *et al.*, 2016, Jiménez-López *et al.*, 2019). Según la NOM-059-SEMARNAT, 185 especies de orquídeas están una categoría de riesgo, donde 111 especies están sujetas a protección, 59 especies están en categoría de amenazadas y 15 en peligro de extinción, donde *Vanilla planifolia* se encuentra sujeta a protección, debido a la sobre explotación que ha tenido en los últimos años, lo que ha provocado la reducción de las poblaciones silvestres y reducido significativamente la diversidad genética (Soto-Arenas 1999; SEMARNAT, 2010).

2.3. Importancia de la Vanilla en México

Vanilla planifolia es una orquídea hemiepífita originaria de México que ha sido de gran importancia desde la época prehispánica en Mesoamérica, donde era utilizada para elaboración de fragancias, como tributo, como moneda de cambio, para aromatizar el chocolate, de manera medicinal y en la cultura totonaca se le vinculaba

con leyendas y rituales. La vainilla fue conocida con diferentes nombres como Xahant por los totonacas, Tlilxochtl (flor negra) por los aztecas y Cizbiques por los Mayas (Lubinsky *et al.*, 2008; Soto y Dressler, 2010; Gamboa-Gaitan, 2014). Sin embargo, a la llegada de la conquista española ellos la nombraron vainilla ya que sus frutos se le asemejaban a la vaina que enfunda la espada (Bermúdez-Avenidaño y Treviño-Treviño, 2014).

México es un país que posee gran diversidad del género *Vanilla* como: *Vanilla cribbiana*, *V. odorata*, *V. inodora* Schiede, *V. phaeantha*, *V. hameri*, *V. insignis* Ames, *V. perpleja*, *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. Sp. M. Soto 8355* (Soto, 2003), no obstante, solamente *V. pompona* y *V. planifolia* se cultivan con fines comerciales, debido a que son demandadas en la industria (Lubinsky *et al.*, 2008; Reyes-López *et al.*, 2008).

V. planifolia es muy importante ya que su fruto beneficiado es utilizado en la industria como aromatizante, en el área vinícola, tabacalera, farmacéutica, saborizante y es una de las especies más utilizadas en la gastronomía mundial, siendo la segunda especie más cara del mundo (Espinoza Pérez, 2016; Divakaran, 2009; Lamas, 2012; Gallage, y Møller, 2015).

En la actualidad los principales países productores de *V. planifolia* son, Indonesia Madagascar y China, aun cuando la vainilla se le considera originaria de México su contribución a nivel mundial en la producción es del uno por ciento (Diez-Gómez, 2014; Reyes-López *et al.*, 2014), en México los principales estados productores de vainilla en México son: Veracruz con un 76.08%, Puebla con un 11.55%, Oaxaca con 10.5% y San Luis Potosí con 1.87% (SIAP, 2021).

2.4. Descripción de *Vanilla planifolia*

V. planifolia es la única orquídea que produce frutos comestibles, consta de un crecimiento perene, trepadora con dos tipos de raíces: las raíces adventicias y las raíces terrestres, por lo que es considerada una orquídea hemiepífita.

Su tallo es color verde, flexible, cilíndrico simple y posee nudos de 5 a 15 cm de longitud, sus hojas se encuentran dispuestas a manera de zigzag a lo largo del tallo, son hojas suculentas flexibles de tamaño hasta 20 cm. Sus inflorescencias crecen de la parte axilar de las hojas, teniendo de 15 a 20 botones, sus brotes tienen un tamaño de hasta 8 cm y sus flores son color verde amarillo con 3 sépalos, 2 pétalos y un labelo. El fruto de la orquídea es una cápsula color verde de 15 cm de longitud, ligeramente triangular, que contiene semillas en su interior de color negras, denominada “vainas” que para ser comercializada debe de tener un proceso llamado beneficiado. El fruto carece del olor, color y sabor, característicos de la vainilla (Figura 1) (Vargas-Hernández y Gámez-Velázquez, 2014).

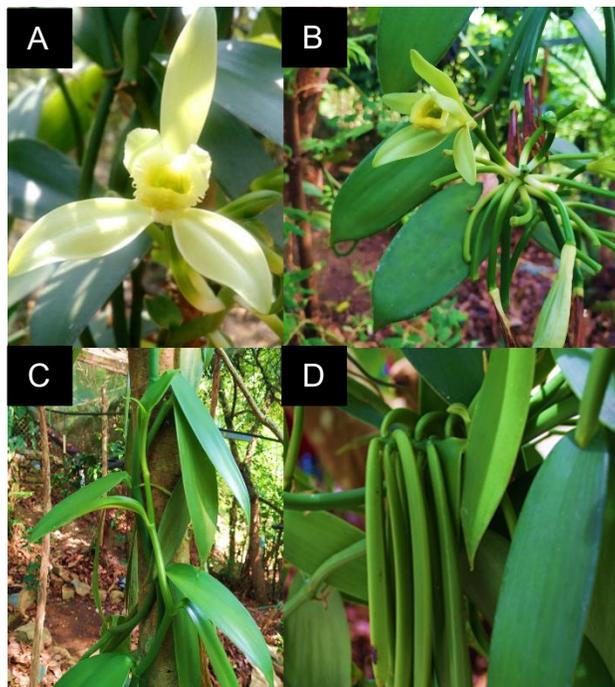


Figura 1. Secciones vegetales de *V. planifolia*. **A)** Detalle de flor. **B)** Planta completa. **C)** Hojas y Tallos. **D)** Fruto (Vainas verdes) (Tomado de Morales-López, 2021).

2.4.1. Clasificación taxonómica de *V. planifolia*

En la Tabla 1, se presenta la descripción taxonómica de *V. planifolia*, descrita por Hernández-Hernández *et al.*, 2011.

Tabla 1. Descripción taxonómica de *V. planifolia*

Clasificación	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae
Subfamilia:	Vanilloideae
Tribu:	Vanillinae
Genero:	<i>Vanilla</i>
Especie:	<i>Planifolia</i>

Debido a la gran sobre explotación que se le ha dado a la vainilla, para su uso comercial y a los largos periodos de crecimiento y maduración de sus frutos se han buscado alternativas como el cultivo de tejido *in vitro*. La propagación *in vitro* ha sido muy utilizada en los últimos años ya que proporciona ventajas de control en el cultivo que no tiene la propagación convencional (Carranza-Álvarez *et al.*, 2016).

2.5. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV), está basado en el concepto de totipotencia; lo que significa que las células y tejidos tienen la capacidad de convertirse en planta completamente nueva a partir de cualquier sección de la plántula (Fowler *et al.*, 1993; Trevor, 2007; Bhatia y Dahiya, 2015) (Figura 2). El sistema de CTV confiere todo lo necesario para que las plántulas o explantes crezcan a través de un medio basal, donde el material vegetal obtiene nutrientes, energía, agua y con la luz y temperatura optimas proporcionan las condiciones ideales para el desarrollo vegetal (Phillips y Garda, 2019; Varela, 2023). El CTV desempeña un papel muy importante en la biotecnología moderna ya que con ella se realizan diversas investigaciones sobre procesos de desarrollo vegetal, modificación genética de plantas para procedimientos agroindustriales en la industria de alimentos, mejorando la producción de alimentos libres de patógenos (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2018),

preservación de germoplasma (Trujillo *et al.*, 2019), funcionamiento de genes (Deng *et al.*, 2010), micropropagación (Kumar y Redd, 2011; Carranza-Álvarez *et al.*, 2016), reprogramaciones genéticas que pueden dar lugar a cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Téllez Torres *et al.*, 2023).

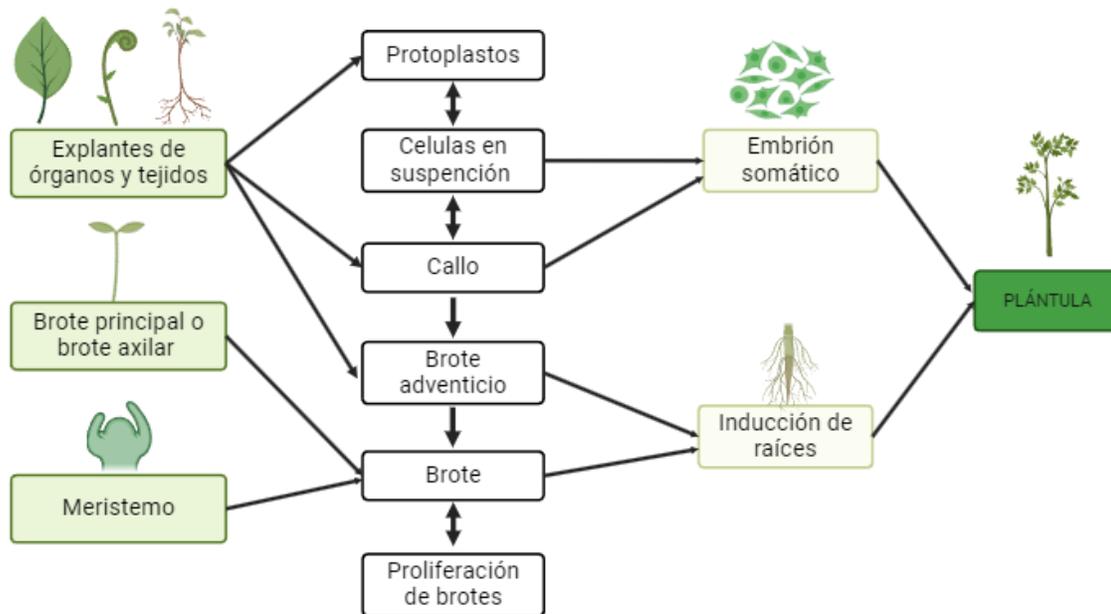


Figura 2. Obtención de una planta nueva a partir de una sección vegetal en la técnica de cultivo de tejidos vegetales (Modificado de Lindsey & Jones, 1989).

El CTV ha sido utilizado para la producción de compuestos bioactivos de plantas por medio de modificación de ambientes produciendo estrés en las plantas provocando la síntesis de metabolitos secundarios que naturalmente son de utilidad para la planta como defensa o comunicación, por lo que estos compuestos bioactivos han sido aprovechados en la industria como fragancias, pigmentos y en farmacéutica que son costosos de sintetizar y que ocurren naturalmente en bajas concentraciones en situaciones específicas (Pant, 2014; Varela, 2023).

Otro uso que se le ha atribuido a esta herramienta biotecnológica es la preservación de especies en peligro de extinción o en categoría de amenaza por medio la propagación y la biotecnología vegetal, donde la micropropagación *in vitro* ha sido

la más utilizada, misma que consiste en propagar explantes o secciones vegetales de manera asexual en un medio de cultivo rico en nutrientes, utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. (Rosales *et al.*, 2008).

2.6. Micropropagación *in vitro*

La micropropagación es una tecnología *in vitro* de multiplicación rápida de plantas que utiliza métodos modernos de cultivo de tejidos vegetales. Es bien conocido por sus aplicaciones en las industrias agroalimentaria, hortícola y forestal, consiste en el cultivo de explantes en un medio de cultivo el cual contiene agua, macronutrientes y micronutrientes, fuente de carbono como carbohidratos en forma de sacarosa o glucosa, vitaminas, minerales, reguladores de crecimiento naturales y artificiales como auxinas, citoquininas, giberelinas y un agente gelificante. El explante más usado para la propagación *in vitro* son las yemas vegetativas, los frascos se colocan con luz artificial dentro de una cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores de 21 °C y 23 °C, además de controlar el tiempo de exposición a la luz (Castillo, 2004; Abdalla *et al.*, 2022), el contenido de reguladores de crecimiento dependerá de la planta que se esté micropropagando y la etapa de micropropagación en la que se encuentre.

Las ventajas de la micropropagación *in vitro* son las siguientes: 1) Mayor número de plantas en menos tiempo. 2) El ambiente puede controlarse o modificarse para satisfacer las necesidades específicas de la planta. 3) Material vegetal disponible todo el año. 4) Identificación y producción de clones con características deseadas. 5) Producción de plantas genéticamente modificadas nuevas y mejoradas. 6) Conservación de especies vegetales en categoría de amenazadas. 7) Preservación de material genético mediante criopreservación. 8) Producción de metabolitos secundarios.

Los primeros reportes de la micropropagación fueron realizados por Murashige, (1974) con tres etapas: 1. Establecimiento libre de microorganismos (aséptico), 2. multiplicación, y 3. enraizamiento y la preparación de la plántula para su

transferencia tecnológica, posteriormente Hussain *et al.* (2012) completaría este proceso dando lugar a las etapas que actualmente se conocen (Figura 3).



Figura 3. Etapas de la micropropagación *in vitro*. Recuadros amarillos representan las etapas de la micropropagación *in vitro* y las beige etapas intermedias (Autoría propia).

Etapas de la micropropagación *in vitro*:

Etapas de la micropropagación *in vitro*: La planta donante o planta madre es el material vegetal de donde se obtiene el material vegetal de partida, se recomiendan plantas que crecen en condiciones de invernadero para reducir la tasa de contaminación. El utilizar explantes o yemas de plántulas jóvenes tienen una mayor respuesta que los establecidos de secciones a partir de plántulas más adultas (Segretín, 2006).

Etapa I: Asepsia del material vegetal: La desinfección superficial consiste en la eliminación de la incidencia de agentes contaminantes presentes en la superficie de los tejidos o explantes, los propágulos de enjuagaran con abundante agua para la eliminación de polvo, seguido de esto se utilizan una serie de soluciones desinfectantes como: hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, bicloruro de mercurio, tween 20, peróxido de hidrogeno, incluso etanol (García *et al.*, 2004;; Uribe *et al.*, 2008; Brenes *et al.*, 2015; Bolaños *et al.*, 2019), así mismo, para la contaminación endógena por hongos, levaduras o bacterias se utilizan bactericidas y fungicidas, esto en caso que la planta madre provenga de campo y no de invernadero.

Etapa II: Establecimiento del cultivo: El objetivo de esta etapa es la selección de un medio de cultivo adecuado para la planta que se va a micropropagar de acuerdo con sus necesidades nutrimentales para la propagar y aumentar la cantidad de brotes para destinarlos a la siguiente etapa.

Los medios de cultivo varían de componentes de acuerdo con las características del tejido a desarrollar y el proceso morfogénético que se desea seguir (Gamborg y Shyluk, 1981).

El medio de Murashige y Skoog (1962) es el más utilizado a nivel mundial en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ya que contiene un alto contenido de sales. Otros tipos de medio de cultivo utilizados son el medio Knudson C y Vacin and Went, (Reddy *et al.*, 2016). Los medios de cultivo también son suplementados con sacarosa como fuente de carbono y reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y giberelinas, por lo que alto contenido de auxinas inducirá el crecimiento de raíces, mientras que las concentraciones altas de citocininas promueven la división celular el regenera miento de brotes (Schäfer *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2017; Cox *et al.*, 2018).

Etapa III: Enraizamiento de los explantes: El objetivo de esta etapa es la inducción de raíces en los explantes propagados ya que las plántulas y brotes

obtenidos en la fase anterior carecen de raíces, por esto mismo se añaden auxinas o sustratos orgánicos que promuevan el crecimiento de raíces.

El suplemento de medios de cultivo con auxinas de origen natural o sintéticas promueve la formación de raíces adventicias un ejemplo de estas es Acido indol acético (AIA), Ácido indol butírico (AIB) o sintéticas como Ácido naftalenacético (ANA), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Pirocam, Ácido 2, 4, 5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (Palma Mora, 2020). La selección del tipo de auxina dependerá de la planta a propagar, el tamaño, grosor y alcance de las raíces.

Etapa IV: Aclimatación: El objetivo de esta etapa es completar el proceso de micropropagación obteniendo el mayor número de plantas adaptadas a condiciones ambientales. Si embargo, las plantas provenientes de cultivo *in vitro* carecen de la habilidad de producir carbohidratos, poseen baja competencia fotosintética, baja capacidad para fijar CO₂, por lo que se recomienda una fase intermedia de pre-aclimatación donde se les disminuya poco a poco la humedad relativa para garantizar una mayor sobrevivencia en esta etapa (Carranza-Álvarez *et al.*, 2016). No obstante, otra alternativa de la micropropagación son el uso de biorreactores de inmersión temporal los cuales aumentan significativamente la sobrevivencia de las plántulas *ex vitro*.

2.7. Biorreactores de inmersión temporal

Como una alternativa de la micropropagación *in vitro* y el avance de la tecnología surgió el implemento del sistema de inmersión temporal (SIT), como fortalecimiento del sistema de propagación tradicional, debido a que permite la automatización de la producción a mayor escala dando como resultado una mayor obtención de biomasa en menor tiempo, además que el SIT elimina problemas fisiológicos y disminuye significativamente los costos de la micropropagación *in vitro* como: la baja sobrevivencia de las plántulas y la escasa calidad de los explantes, reduce la vitrificación por el control de exposición de los explantes al medio de cultivo, permite la renovación constante del aire eliminando gases producidos dentro del frasco,

favoreciendo el desarrollo vegetal de las plántulas, así mismo, el contacto directo con el medio de cultivo en cada inmersión garantiza una absorción más eficiente de nutrientes., se favorece la formación de raíces y estomas funcionales que garantizan la supervivencia de las plántulas al medio ambiente natural (Muñiz, 2018; Delgado y Luque, 2023).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT), establecen una alternativa asequible debido a que permite automatizar parcialmente algunas etapas del cultivo *in vitro*, aumentando la eficacia de producción vegetal sin efectos colaterales ocasionados por los medios de cultivo líquido estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia (Ontaneda *et al.*, 2020), además que los frascos empleados reducen la densidad del inóculo por envase empleado, aumentando así el espacio físico necesario para el crecimiento de plántulas.

Los recipientes utilizados en esta técnica son denominados biorreactores ya que debido a su estructura permiten desarrollar los procesos biológicos necesarios como la transferencia de oxígeno ya que está conformado por un sistema de renovación constante de gases en el interior del recipiente, existen diferentes tipos de biorreactores de inmersión temporal establecidos comercialmente y utilizados para la propagación vegetal como los RITA® (Méndez Alegría, 2014; Magaña *et al.*, 2019; de Lourdes Tapia y Pando, 2022; Villegas-Ramírez y Palma-Zúñiga, 2022), MATIS® (Cruz Villegas, 2018), SETIS™ (Navarrete Yáñez *et al.*, 2019; Arevich y Pérez, 2021), BIOMINT® (Calvache Román y Freire Alarcón, 2019), BIT® (Villegas-Ramírez, 2021; Villegas-Ramírez y Palma-Zúñiga, 2022), por mencionar algunos entre otros biorreactores no patentados elaborados en laboratorios (Contreras-Loera *et al.*, 2015; Cajina Silva, 2023). Sin embargo, el fundamento de su funcionamiento es muy similar (Figura 4).

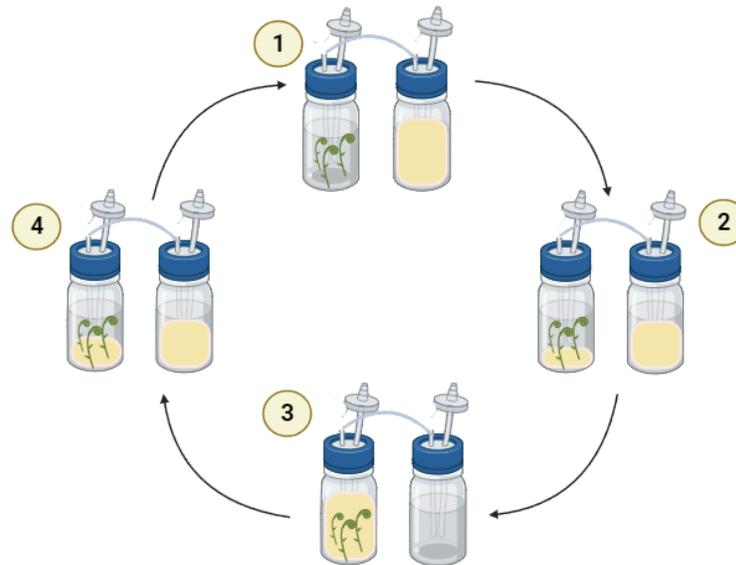


Figura 4. Fundamento del funcionamiento de un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). **1)** Período estático, donde las líneas de aireamiento y el recipiente de almacenamiento del medio de cultivo están cerradas y las válvulas solenoides abiertas al medio exterior. **2)** Migración del medio de cultivo al contenedor del material vegetal, suceso que ocurre al abrir la línea de aire proveniente del compresor pasando por los filtros conectada a recipiente el medio de cultivo, la sobrepresión transporta el líquido hacia el material vegetal. **3)** Período de inmersión; al transportarse el medio de cultivo al frasco del material vegetal se cierran las líneas de aire y solo quedan abiertas las válvulas solenoides abiertas a la atmósfera. **4)** Devolución del medio de cultivo a su recipiente, para esto la línea de aire conectada al frasco con material vegetal se abre y la del recipiente de almacenamiento del medio se encuentra cerrada ocasionando que la presión devuelva el medio de cultivo a su recipiente original (Modificado de Georgiev *et al.*, 2014).

Los BIT al ser una tecnología de producción vegetal a gran escala, son una alternativa eficaz para propagar plantas en riesgo como *V. planifolia* que es orquídea en estado de amenaza por su amplia explotación comercial, y susceptibilidad al ataque de patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vainillae* (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015), por ello, se ha multiplicado a través del cultivo de tejidos vegetales, aunque los costos de producción suelen ser elevados, se ha optado el uso de esta tecnología, para optimizar y reducir costos (Sreedhar *et al.*, 2009), utilizando brotes, tallos como explantes. Ramos-Castellá y colaboradores (2014), probaron la inmersión de brotes de vainilla en distintos Biorreactores y

observaron un mayor número de brotes por explantes en sistemas BIT®, seguido del sistema RITA® y GRANDE. Por otro lado, Ramírez-Mosqueda y Bello-Bello (2021), compararon medio semisólido (SS), medio líquido en inmersión parcial (PI) e inmersión temporal (TI) utilizando el biorreactor SETIS™ demostrando que en el sistema de inmersión temporal se obtiene mayor biomasa.

2.8. Medicina tradicional

La medicina tradicional está basada en conocimientos, habilidades, prácticas, y conocimiento empírico, basado en teorías, creencias, leyendas, experiencias que no necesariamente tienen explicación, heredados de generación en generación de culturas diferentes utilizada para el diagnóstico y tratamientos de enfermedades físicas para mantener la salud (OMS, 2008).

Una de las aplicaciones más prometedoras y extendidas de la cultura tradicional y las terapias alternativas son las plantas medicinales. estimase tiene un estimado de aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional y que sigue siendo en gran medida atención primaria de salud (Hoff, 1997; Who, 2005; Castañeda-Sánchez, 2008).

La utilización de plantas medicinales en México se remonta desde la prehistoria, las civilizaciones mantenían una relación con su entorno vegetal así que al experimentar con el uso de las plantas descubrieron las propiedades medicinales de diversas plantas, utilizando diferentes secciones vegetales como hojas, tallos, raíces, bulbos y flores. Aunado a esto el registro documentado del uso de plantas medicinales data desde el siglo XVI a la llegada de los españoles, documentado en dos códices: *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, mejor conocido como el Códice de la Cruz Badiano (1552) y el Códice Florentino (1577-1580) donde se narra el uso de flores como el nardo (*Polianthes tuberosa*) y el cempasúchil (*Tagetes erecta*) (Viveros-Espinosa, 2020; Bye y Linares, 2015).

En el país existen 23,400 plantas vasculares, de las cuales 3000 tienen efectos medicinales (Bye, 1993; Argueta *et al.*, 1994; CONABIO, 2006). La Medicina

Tradicional es ampliamente usada por los mexicanos, se practica en el entorno familiar o por curanderos/ brujos expertos en comunidades como en ciudades, donde los tratamientos incluyen desde limpias, infusiones, pomadas, ventosas, temazcal y emplastos (Prieto-González *et al.*, 2004; Gil-Rodríguez *et al.*, 2020).

El uso tradicional de plantas ha sido parte importante de la cultura mexicana y se ha preservado a lo largo de los años especialmente en culturas indígenas y mestizas (Solano *et al.*, 2010). Se ha identificado en particular al género Orchidaceae como una de las especies con mayor riqueza cultural, florística y económica que en el país ha sido utilizada desde la época de Mesoamérica para ritos ceremoniales y de manera medicinal (Hernández, 1959; Sahagún, 1975; Flores-Palacios y Valencia Díaz, 2007; Damon, 2020).

Sin embargo, sólo un pequeño número de plantas medicinales han sido estudiadas por sus efectos farmacológicos, fitoquímicos y toxicológicos, así como por su farmacocinética (Castro, 2022); Por lo tanto, esta población necesita recurrir a la medicina alternativa, incluyendo plantas medicinales, las cuales son prescritas por los “yerberos” o curanderos tradicionales (Rendón Martínez, 2023).

2.9. Usos medicinales de las orquídeas

La familia Orchidaceae es una de las familias botánicas más amplias alrededor del mundo, debido a que cuenta con alrededor de 30,000 especies (Willis, 2017). Donde solo el 2.3 % cuentan con propiedades medicinales (Allkin, 2017). Esta familia es utilizada principalmente con fines ornamentales por sus exuberantes flores, para fines ceremoniales y medicinales, sin embargo, solo una minoría de las orquídeas utilizadas con fines etnofarmacológicos han sido estudiadas en laboratorio (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de la familia Orchideaceae con efectos medicinales estudiados científicamente.

Orquídea	Tipo de crecimiento	Efecto	Referencia
-----------------	----------------------------	---------------	-------------------

<i>Acampe ochracea</i> (Lindl)	Epifita	Hepatotoxicidad	Ahmed <i>et al.</i> , 2021.
<i>Catasetum integerrimum</i> Hook	Epifita	Antinociceptivo y antiinflamatorio	Caudillo-Gaona <i>et al.</i> , 2023.
<i>Catasetum macroglossum</i> Rchb.f	Epifita	Efecto antiinflamatorio	Ramos <i>et al.</i> , 2012.
<i>Cyrtopodium macrobulbon</i> (Lex.)	Epifita	Antinociceptivo	Yáñez-Barrientos <i>et al.</i> , 2022.
<i>Dactylorhiza hatagirea</i> (D. Don) Soo	Terrestre	Antisépticos y anticancerígenos	Wani <i>et al.</i> , 2020.
<i>Dendrobium chryseum</i> Rolfe	Epifita	Actividades citotóxicas	Pant <i>et al.</i> , 2021.
<i>Dendrobium crumenatum</i> S.w.	Epifita	Antimicrobiano	Sandrasagarán <i>et al.</i> , 2014.
<i>Dendrobium officinale</i> Kimura & Migo, 1936	Epifita	osteoporosis	Wang <i>et al.</i> , 2018.
<i>Encyclia michuacana</i> (Lex.) Schltr	Epifita	Relajante y antiespasmódicos	Gutiérrez y Solís 2009.
<i>Habenaria intermedia</i> D. Don	Terrestre	Actividad antioxidante	Arora <i>et al.</i> , 2023.
<i>Laelia anceps</i> Lindl	Epifita	vasorelajantes y antihipertensivos mediante canales de calcio/ antinociceptivo	Vergara-Galicia <i>et al.</i> , 2010. / Yáñez-Barrientos <i>et al.</i> , 2022.
<i>Laelia speciosa</i> (Kunth) Schltr	Epifita	Antihipertensivo y vasorelajante	Vergara-Galicia, 2013.
<i>Maxillaria densa</i> Lindl	Epifita	antinociceptivo, antiinflamatorio	Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2007.

<i>Oncidium ascendens</i> Lindl.	Epífita	Inhibición de células cancerígenas	Williams <i>et al.</i> , 2012.
<i>Pelatantheria Insectifera</i> (Rchb.f.) Ridl.	Epífita/Litofita	Actividad antioxidante y antiinflamatoria	Hoque <i>et al.</i> , 2021.
<i>Prosthechea karwinskii</i> (Mart.) J.M.H.Shaw	Epífita	Antiinflamatorio/ disminuyen la obesidad, la resistencia a la insulina, el estado proinflamatorio y el riesgo cardiovascular	Perez Gutierrez <i>et al.</i> , 2011. /Barragán-Zarate <i>et al.</i> , 2021.
<i>Prosthechea michuacana</i> (Lex.) W.E.Higgins	Terrestre	Nefroprotectora/ Antidiabético	Gutierrez <i>et al.</i> , 2010./ Gutierrez y Carlos, 2011.
<i>Scaphyglottis lívida</i> (Lindl.) Schlt	Epífita	antinociceptivo, anti-inflamatorio	Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2007.

2.10. Vainilla medicinal

Además del uso comercial, la vainilla se utiliza como alternativa en la medicina tradicional (Ferrera, 2020). El uso medicinal de *V. planifolia* proviene desde Mesoamérica alrededor del año 1300. Los mayas fueron los primeros en utilizar las vainas de vainilla con fines medicinales para tratar las picaduras de insectos venenosos y curar heridas. Un manuscrito azteca de hierbas, escrito en 1552 por españoles que exploraron Mesoamérica, menciona el uso de la vainilla como unguento para el tratamiento de sífilis (Rain, 2004). Recientemente en 2019, Rodríguez-López y Martínez-Castillo, realizaron una investigación en donde exploraron el uso y conocimientos que tenían mayas en el norte de Yucatán México sobre las propiedades y usos medicinales de *V. planifolia*, como antinociceptivas de las hojas, inducción del parto, propiedades antitumorales de los tallos y raíces, así como el uso de las flores como cicatrizantes, depresión y dolor.

Por otro lado, Vijaybabu y Punnagai (2019), demostraron las propiedades antiproliferativas del extracto de hojas de *V. planifolia* en carcinoma celdas A43, mediante un ensayo MTT, donde obtuvieron una CL₅₀ (Concentración Letal Media) contra células A431 de 31.2 µg/mL, donde se reveló la capacidad antitumoral del extracto de hojas de *V. planifolia*. Asimismo, Amalnath y colaboradores (2020), realizaron un extracto etanólico de tallo de *V. planifolia* y evaluaron el potencial antiproliferativo de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 de este extracto, en donde el 16% de las células mostraron apoptosis y en el estadio G0/G1 mostró 50,72 % y la fase S mostró 12.3% y 17.42% de células en fase G2/M. En este estudio nuevamente se demuestra las propiedades antitumorales que poseen estas secciones vegetales. Sin embargo, la mayoría de los primeros usos medicinales de la vainilla han dado paso a usos funcionales de la vainillina, el componente principal de la vainilla. Hoy en día, debido a la escasez de vainas de vainilla y la alta costo de producción la vainillina es producida en gran parte sintéticamente por la vía química. En la Tabla 3, se resumen algunas de las propiedades medicinales de algunas de las secciones vegetales de *V. planifolia*.

Tabla 3. Secciones de *V. planifolia* más utilizadas para uso medicinal.

Especie	Sección utilizada	Forma de preparación	Uso	Referencia
<i>Vanilla planifolia</i>	Hojas	Extracto etanólico	Carcinoma	Vijaybabu, 2019
<i>Vanilla planifolia</i>	Tallo	Extracto etanólico	Cáncer de mama MCF-7	Amalnath <i>et al.</i> , 2020
<i>Vanilla fragrans</i>	Tallos y hojas	Extracto etanólico	Toxico para mosquitos	Sun <i>et al.</i> , 2001
<i>Vanilla planifolia</i>	Vaina	Extracto metanólico	Alzheimer inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI)	Kandu y Mitra, 2013
<i>Vanilla planifolia</i>	Vaina	Jugo de vainilla mediante el proceso de curado	Antifúngica (<i>Alternaria alternata</i>)	Romero-Cortez <i>et al.</i> , 2019

<i>Vanilla planifolia</i>	Semilla	Extracto etanólico	Antiinflamatorio	Sarak y pandit, 2022
-	Vainillina	-	protección al ADN contra el daño inducido por la radiación	Maurya <i>et al.</i> , 2007
-	Vainillina	-	Dolor neuropático	Beaudry <i>et al.</i> , 2010
-	Vainillina	-	Citotóxico	Lirdprapamongkol <i>et al.</i> , 2005
-	Vainillina	-	Anemia falciforme	Abraham <i>et al.</i> , 1991
-	Vainillina	-	Aberraciones cromosómicas en células V79	Keshava <i>et al.</i> , 1998
-	Vainillina	-	Inhibidores de la PK-ADN	Durant y Karran, 2003
-	Vainillina	-	Citotóxico	Shen y Zu, 2021

2.11. Capacidad Antioxidante

La oxidación es un proceso en la que los electrones se transfieren de un átomo a otro y la molécula que pierde un electrón pasa a estar oxidada, esto lleva a cabo el estrés oxidativo produciendo radicales libres son producidos a nivel intracelular y extracelular, como un producto secundario en la fosforilación oxidativa en la mitocondria por la cadena de transporte de electrones y como intermediarios en reacciones con oxígeno (Kopustinskiene, *et al.*, 2020). Son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados y buscan la estabilidad capturando electrones, estos comprenden radicales de nitrógeno, azufre, cloro, y los más abundantes radicales de oxígeno, dando lugar a las especies reactivas de oxígeno (ROS). Al ser especies altamente reactivas estas se unen al ADN, proteínas, carbohidratos, y lípidos; lo que conduce a daños celulares como la muerte celular por apoptosis, ocasionando una cascada de alteraciones que desembocan en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Nahar *et al.*, 2017).

La actividad antioxidante es la capacidad que poseen ciertas sustancias de retrasar o inhibir la degradación oxidativa (Gutteridge, 1994). Los antioxidantes se dividen en dos grupos, antioxidantes primarios determinada por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres rompiendo la reacción por la donación de un hidrogeno; tales como los compuestos fenólicos, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción y los antioxidantes secundarios que no están relacionados con la captación de radicales libres, sino a la quelación de metales, la regeneración de antioxidantes primarios, la descomposición de hidroperóxidos y la eliminación de oxígeno, entre otros y se encargan de retardar la degradación oxidativa (Jadhav, 1996; Zapata *et al.*, 2007; Londoño Londoño, 2012).

En el reino vegetal se resaltan algunos fitoquímicos con actividades antioxidantes como los compuestos fenólicos, terpenos, sustancias azufradas y alcaloides (nitrogenadas), de los cuales las sustancias fenólicas, terpenicas y azufradas son las de mayor relevancia en alimentos de origen vegetal (Schnorr Vargas, 2019; Tomás -Barberan, 2003)

2.11.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos engloban todas las sustancias que en su estructura poseen varias funciones fenol, el cual recibe el nombre de hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Los compuestos fenólicos son los principales metabolitos secundarios de las plantas y fungen como pigmentos, reguladores genéticos y como modo de defensa ante patógenos microbiológicos (Creus, 2004; Payá *et al.*, 2021). Su efecto antioxidante se debe a que actúan como agentes reductores, donantes de hidrogeno y receptores de oxígeno y en poca frecuencia quelando metales (Ruiz Roca, 2009).

Los compuestos fenólicos se encuentran en las plantas, frutos y su cantidad depende del tipo de planta, condiciones ambientales, madurez del fruto, ubicación geográfica y composición del suelo (Haminiuk *et al.*, 2012), además tienen una importante función en la dieta humana como la eliminación de especies reactivas

de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) que son los principales causantes de daño celular, lo que ocasiona enfermedades como el Alzheimer, síndrome metabólico y problemas cardiovasculares (López-Alarcón y Denicola, 2013; Shay *et al.*, 2015), adicionalmente, se les atribuyen, antialérgica, antitrombóticas, antimicrobianas, y anticancerígenas (Van Dorsten *et al.*, 2012; Groh *et al.*, 2013; Hintze *et al.*, 2015), propiedades antiinflamatorias, dislipidemia, hipoglucémicas, (Moreno-Jiménez *et al.*, 2015; Hilario Sinche, 2020; Pineda-Lozano *et al.*, 2021).

Se clasifican en grupo de no flavonoides como: polifenoles volátiles, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, lignanos y cumarinas. En el grupo de flavonoides como: flavonoles, antocianidinas flavan-3-ols, flavanonas, flavonas, isoflavonas, taninos condensados, dihidroflavonoles, y chalconas. (Gonçalves *et al.*, 2013). Su principal síntesis es por medio de la ruta acetato/malonato, la ruta de ácido shikimico y ruta de taninos condensados (Figura 5).

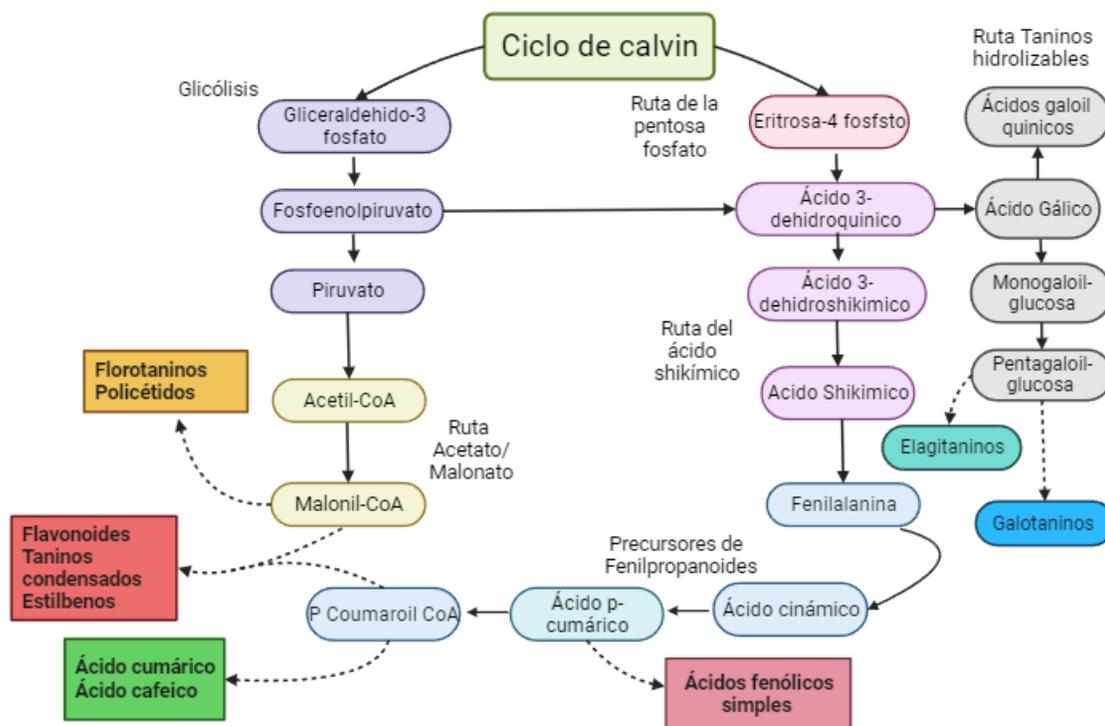


Figura 5. Esquema que muestra las rutas de biosíntesis de diferentes grupos de taninos y otros compuestos fenólicos (Tomado de Salminen y Karonen, 2011).

2.11.2. Flavonoides

Los flavonoides son derivados de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina (Routray y Orsat *et al.*, 2012), además, son la clase más grande de polifenoles y se ha estimado que comprenden más de 8000 metabolitos: se componen de una estructura básica de difenilpropano en donde dos anillos aromáticos están unidos a través de una cadena de tres carbonos (Wen *et al.*, 2020). Los flavonoides se pueden clasificar en 12 subgrupos: flavanonas, flavonas, isoflavonas, estilbenos, flobafenos, chalconas, dihidroflavonoles, auronas, flavonoles, leucoantocianidinas, antocianinas y proantocianidinas (Liu *et al.*, 2021).

Son necesarios para el desarrollo vegetal debido a que tienen efecto sobre algunas enzimas importantes en la fisiología vegetal como transportadores de hormonas y ADN, quelan iones metálicos como el Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , actúan como señaladores químicos y eliminan radicales libres como radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos (Quiñones *et al.*, 2012).

Los flavonoides son los responsables de los principales pigmentos de las plantas, de los pigmentos azules, rojos, naranjas, morados se encargan las antocianinas, colores amarillos las chalconas, pigmentos blancos y amarillos pálidos las flavonas y flavonoles (Grotewold, 2006).

Al ser consumidos por el ser humano mediante frutas, hortalizas, legumbres, cereales integrales estos ejercen beneficios importantes en el cuerpo como efectos antibacterianos, cardioprotector, anticancerígenos, antitrombótica, vasodilatadora, gastroprotectora, antiinflamatoria y antinociceptiva (Grassi, 2009; Chami *et al.*, 2018; Hernández Guiance *et al.*, 2019; Maleki, *et al.*, 2019).

2.12. Dolor

El dolor es el síntoma principal reportado por pacientes en consulta médica. Se define como: “Una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una

lesión tisular real o potencial” por la asociación internacional del dolor (IASP). (Ibarra, 2006; Kumar y Saha, 2011). Su función es detectar y localizar daños en el organismo con el fin de proteger el organismo y mantener la homeostasis. También se considera un fenómeno que puede estar asociado o no con daño o patología tisular (Del Arco, 2015). Sin embargo, se caracteriza por tener una variabilidad interindividual y a él se asocian variables como: el sexo, edad, grupo étnico o incluso psicosociales (Fillingim, 2017).

2.12.1. Clasificación del dolor

Según su duración

Dolor agudo: El dolor agudo es una respuesta fisiológica de corta duración ante un estímulo adverso como traumatismos o intervenciones quirúrgicas o incluso cólicos o cefaleas, suele estar localizado, aparece como signo de alarma y está asociado a un daño tisular, se refleja como espasmos musculares y conlleva a la producción de estrés, tiene una duración de aproximadamente un mes a tres meses (Carr y Goudas, 1999; Merskey y Bogduk, 1994; Del Arco, 2015).

Dolor crónico: El dolor crónico se refiere a dolor persistente, episódica y concurrente que dura más de tres meses y se presenta incluso cuando la lesión ha sido curada, su aparición suele afectar la calidad de la vida del enfermo (Barroso *et al.*, 2021).

Según su origen

Dolor nociceptivo: El dolor nociceptivo se origina por estímulos fisiológicos inflamatorios, térmicos, químicos o presión en los receptores del dolor (nociceptores) y se define como "Dolor debido a la estimulación de las terminaciones nerviosas nociceptivas primarias", y es generando una respuesta de poca duración que no se asocia a una lesión del sistema nervioso y se divide en somático y visceral (Puebla Díaz, 2005; Kowalski *et al.*, 2023).

Dolor neuropático: El dolor neuropático se define como dolor crónico secundario que se origina una consecuencia de una enfermedad o lesión que afecta al sistema somatosensorial y está presente en el 20% de los pacientes con dolor crónico y se clasifica en central y periférico (Velasco, 2014).

Dolor psicógeno: El dolor psicógeno es el dolor que no está relacionado con alguna afección física, si no que tiene una casusa psiquiátrica como depresión o incluso hipocondría (Pérez Fuentes, 2020).

Según su localización (Nociceptivo)

Dolor somático: El dolor somático se produce cuando se estimulan los receptores del dolor superficiales de la piel, musculoesquelético, articulaciones, ligamentos o vascular, se refiere a un dolor localizado y punzante como el dolor óseo (Puebla Diaz, 2005; González-Arias *et al.*, 2023).

Dolor visceral: El dolor visceral, se origina en las regiones torácica, abdominal o pélvica, suele presentarse como dolor difuso y acompañarse de sintomatología neurovegetativa y puede acompañarse de nauseas, vomito, cólicos y sudoración (Lee *et al.*, 2019).

2.12.2. Fisiología del dolor

Los estímulos del dolor son detectados por receptores denominados nociceptores, estos se encargan de identificar las fibras C las cuales son fibras amielínicas más pequeñas que constituyen la mayoría de los nociceptores periféricos (Rosenquist *et al.*, 2015) y están ubicadas en los tendones de los músculos, los órganos del cuerpo y la piel y transmiten sensaciones dolorosas y ardientes. Y las fibras A δ son nociceptores mielinizados, son fibras grandes y de conducción rápida (Rosenquist *et al.*, 2015; Ignatavicius y Workman, 2016). Algunos responden fácilmente al calor como los receptores mecanotermiales en una quemadura, transmiten un dolor agudo (Ellison, 2017). Además, el estímulo nocivo provoca una sensibilización en los nociceptores aferentes, debido a que se liberan sustancias químicas como

prostaglandinas (PGS), bradicinina, leucotrienos, serotonina, histamina, sustancia P, tromboxanos, iones (H⁺ y K⁺), citocinas y neurotrofinas (Ignatavicius y Workman, 2016). Hay cuatro fases en la nocicepción del dolor: transducción, transmisión, percepción y modulación (Figura 6).

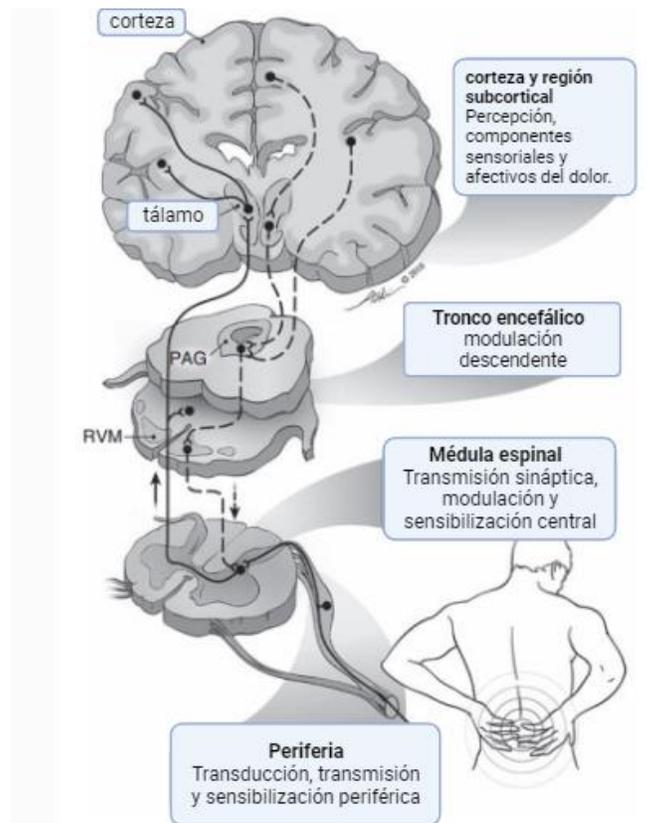


Figura 6. Esquema de los mecanismos de señalización del dolor implicados en la transducción, transmisión, modulación y percepción del dolor (Tomado de Ringkamp Matthias, 2018).

La transducción es el proceso por el cual se reciben estímulos químicos, mecánicos y térmicos, comienza cuando los nociceptores son activados por un estímulo nocivo, lo que ocasiona que se abran los canales de sodio, potasio y calcio creando impulsos eléctricos que se transportan por medio de los axones, son reconocidos como indicadores de dolor: enrojecimiento, hinchazón (Palma y Soto, 2020).

La transmisión: Se refiere al paso de información desde la terminal periférica por los axones, hasta la central terminal de los nociceptores en el sistema nervioso central (SNC). Durante ese proceso se transfiere información de una neurona a otra y la conducción de impulsos de dolor corren por las fibras A δ y C hacia la medula espinal, para formar sinapsis con excitadores o inhibidores interneuronales (McCleskey y Gold, 1999; Rosenquist *et al.*, 2015), aquí es donde el dolor puede ser controlado con opioides ya que bloquean la liberación de neurotransmisores que detienen el dolor. Posteriormente, hacen sinapsis con neuronas de proyección para que la información asciende hasta el cerebro a través de dos tractos espinotalámicos distintos uno rápido para dolor agudo (neoespinotalámico) y de impulsos lentos para dolor crónico (paleoespinotalámico). Estos tractos se conectan para transmitir información al hipotálamo, tálamo y sistema límbico para así ser proyectados al cerebro (Capriotti y Frizzell, 2015; Huether y McCance, 2016).

La percepción se refiere a la interpretación de la información recibida provocando una respuesta específica. La transmisión de los estímulos finaliza en los sistemas reticular y límbico y en la corteza cerebral, que es donde ocurre la percepción (Rosenquist *et al.*, 2015; Huether y McCance, 2016), pero la percepción del dolor obtiene una respuesta diferente en cada individuo.

La modulación del dolor se refiere al cambio o inhibición de los impulsos dolorosos. La inhibición conduce a la liberación de opiáceos endógenos que limitan la liberación de neurotransmisores, por lo que requiere mayores estímulos para alcanzar su potencial de acción. Otras liberaciones químicas son la noradrenalina y la serotonina. La estimulación supraespinal se produce mediante la liberación de neurotransmisores adicionales para mejorar la progresión del estímulo desde las neuronas primarias a las secundarias. Dependiendo de qué vía, aumenta lo que el individuo recibe cognitivamente (Lome, 2005; Capriotti y Frizzell, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del material vegetal

Se utilizaron como explantes de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de aproximadamente 12 meses de edad, previamente desarrolladas bajo condiciones *in vitro* en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la FEPZH, UASLP germinadas por Trinidad-García (2020) a partir de semillas y micropropagadas por Morales-López, (2021). Se seleccionaron las plántulas con mejor el aspecto fisiológico, descartando aquellas con indicios de oxidación o contaminación.

3.1.1. Preparación de medio de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo el medio MS comercial (Murashige y Skoog, 1962) el cual se preparó pesando 4.43 g medio MS, 30 g de sacarosa, 5 g de carbón activado, y se disolvieron en 1 L de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH entre 5.7 y 6.7 con NaOH o HCl 1M. Posteriormente se esterilizó en autoclave (FELISA) por 15 minutos a 15 lb pulg² y 121°C.

3.2. Colocación de Sistema de Biorreactores de inmersión temporal

Se monto el sistema de biorreactores de inmersión temporal siguiendo las instrucciones del fabricante, seguido de esto se realizaron pruebas con la colocación de los biorreactores para observar la presión necesaria para que el flujo de medio de cultivo inundara las plántulas.

3.3. Estandarización de tiempos de inmersión en Sistema de Biorreactores de inmersión temporal

En 1 L de agua destilada se disolvieron 4.43 g de medio MS comercial (Murashige y Skoog, 1962), con 30 g de sacarosa, se ajustó el pH entre 5.7 y 6.7 con NaOH o HCl 1M. Posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 lb pulg² y 121°C. Se colocaron 20 plántulas de *V. planifolia* provenientes de sistema semisólido de 2 cm en campana de flujo laminar en biorreactores tipo Rita con 300

mL de medio de cultivo estéril y se colocaron a una temperatura de 25 ± 2 °C con lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad lumínica de $40 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa del 70% este procedimiento se realizó por triplicado, evaluando la altura de las vitroplantas (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempos de Inmersión utilizados en los Biorreactores de Inmersión Temporal.

Biorreactores	Tiempos de inmersión
20 plántulas	4 horas por 2 min
20 plántulas	8 horas por 2 min
20 plántulas	12 horas por 2 min

3.4. Tratamientos con reguladores de crecimiento

En 1 L de agua destilada se disolvieron 4.43 g de medio MS comercial (Murashige y Skoog, 1962), con 30 g de sacarosa, suplementado con reguladores de crecimiento, se ajustó el pH entre 5.7 y 6.7 con NaOH o HCl 1M. Posteriormente se esterilizó en autoclave por 45 minutos a 15 lb pulg² y 121°C. Se colocaron 10 plántulas de *V. planifolia* provenientes de sistema semisólido de 4 cm en campana de flujo laminar en biorreactores con 300 mL de medio de cultivo a un tiempo de 2 minutos cada 4 horas y se colocaron a una temperatura de 25 ± 2 °C con lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad lumínica de $40 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa del 70% este procedimiento se realizó por triplicado, evaluando la altura de las vitroplantas, numero de hojas, brotes y raíces por 2 meses (Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos con reguladores de crecimiento implementados en biorreactores de inmersión temporal

	Tratamiento	Cantidad
Tratamiento 1	Medio MS (Murashige y Skoog)	4.43 g
	Sacarosa	30 g

	BAP (6-Bencilaminopurina)	3 ppm
	Acido Ascórbico	150 mg/L
	AIA (ácido indol-3-acético)	1.5 ppm
Tratamiento 2	Medio MS (Murashige y Skoog)	4.43 g
	Sacarosa	30 g
	BAP (6-Bencilaminopurina)	2.5 ppm
	ANA (ácido 1-naftalenacético)	1.0 ppm
Tratamiento 3	Medio MS (Murashige y Skoog)	4.43 g
	Sacarosa	30 g
	BAP (6-Bencilaminopurina)	2.5 ppm
	AIB (ácido indol-3-butírico)	1.5 ppm
	Medio MS (Murashige y Skoog)	4.43 g
Tratamiento 4	Sacarosa	30 g
	BAP (6-Bencilaminopurina)	3.0 ppm
	Agua de coco (CW) (10 %)	100 ml
	Acido Ascórbico	150 mg/L

3.5. Elaboración de extracto etanólico de hojas de *V. planifolia* y plántulas provenientes de Biorreactores

Se recolectaron hojas sanas de los plantíos de *V. planifolia* en el ejido la Libertad del municipio de Axtla de Terrazas (San Luis Potosí, México), una vez obtenida la cantidad de hojas necesarias se limpiaron las impurezas con etanol al 70 %, posteriormente se secaron las hojas de *V. planifolia* en una estufa de convección marca LINDERBERBLUE a 45 °C durante 3 días o hasta que las hojas estuvieron completamente secas, posteriormente se pulverizaron en un molino.

Las plántulas provenientes del biorreactor se secaron y se colocaron estufa de convección marca LINDERBERBLUE a 45 °C durante 3 días o hasta que las hojas estuvieron completamente secas, posteriormente se pulverizaron en un molino analítico.

Para la elaboración de los extractos se utilizó como solvente etanol a una concentración de 10 % referente al pulverizado de la planta. La extracción de los compuestos se realizó mediante Microondas Anton para (Tabla 6).

Tabla 6. Rampa de temperaturas para elaboración del extracto etanólico de *V. planifolia*

Pasos	Temperatura	Tiempo (min)
Rampa de temperatura	70 °C	10
Mantención de temperatura	-	7
Enfriamiento	55 °C	3

Por último, se colocó el extracto obtenido en un rotavapor marca BUCHI a 175 mbar y a 45°C de temperatura el baño de agua destilada, para evaporar el etanol del extracto.

3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se realizó mediante las técnicas colorimétricas ABTS^{•+} (Re *et al.* 1999) y DPPH[•] (Brand-Williams *et al.* 1995), Polifenoles totales (Singleton *et al.* 1999) y flavonoides (Re *et al.* 1999; García 2016).

3.6.1. Método ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo- tiazolina-6-acido sulfónico)

Preparación del radical ABTS^{•+}

Se prepararon 5 mL de la preparación del radical ABTS^{•+} 7mM y se hizo reaccionar con 88 µL de la solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2.45mM y se dejó reposar 16 horas. Este radical es estable por 2 días resguardado en oscuridad.

Para ajustar el radical se utilizó etanol a 90 % hasta que la absorbancia se encuentre a 0.70 a una longitud de onda de 734 nm un espectrofotómetro de luz UV.

Medición de radical ABTS^{•+}

Para la medición de la inhibición del radical se colocaron una celdilla de cuarzo 2900 µL del radical ABTS^{•+} con 100 µL de extracto de hojas y de plántulas de biorreactor

de *V. planifolia* y se incubo por 7 minutos a oscuridad y se leyó a una absorbancia de 734 nm en espectrofotómetro UV-VIS.

3.6.1.1. Preparación de la curva de calibración

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó una curva de calibración donde se prepararon estándares de ácido ascórbico a concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 µg/mL. Las mediciones de la curva se realizaron por triplicado. Cada punto de la recta se preparó igual que la preparación de las muestras del extracto. La lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS se llevó a cabo a los 60 min y se leyó a una longitud de onda de 734 nm (Figura 6).

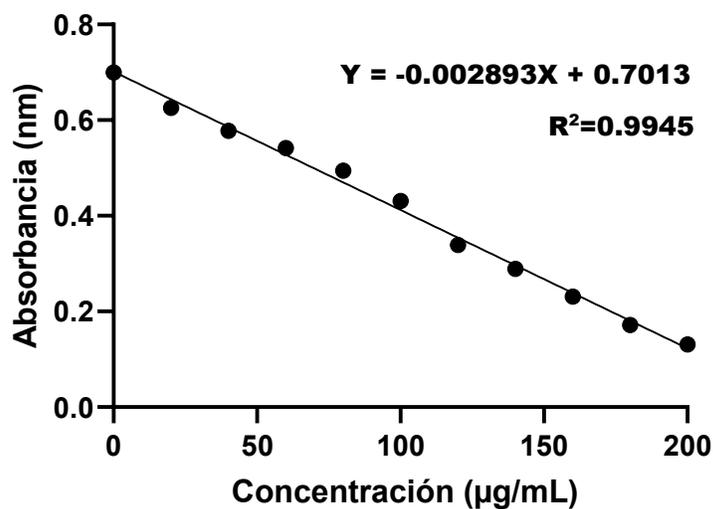


Figura 6. Curva de calibración de ácido ascórbico los 60 minutos para el método ABTS•+.

Los resultados se expresaron como % de Inhibición con la siguiente formula:

$$\% \text{Inhibición ABTS} \bullet + = \frac{AC - AS}{AC} \times 100$$

Donde:

AC: Absorbancia de la solución de ABTS•+ control (0.70) (a 734 nm)

AS: Absorbancia de el extracto después del tiempo

3.6.2. Método DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil)

Se preparo una solución del radical DPPH• a 6.1×10^{-5} M, y se estabilizo con metanol al 80% a una absorbancia de 1.8 a una longitud de onda de 515 nm. (La solución es estable 12 horas).

Medición de inhibición de radical DPPH•

Para la medición de la inhibición del radical se colocaron 2000 μ L de DPPH• con 100 μ L de extracto de hojas de *V. planifolia* a 10 mg/L y se interpolaron los resultados con la curva a la cual se explica cómo se realizó a continuación.

3.6.2.1. Preparación de la curva de calibración

Para la preparación de la curva de calibración se utilizó ácido ascórbico como estándar y se prepararon estándares de 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL, estas disoluciones se prepararon por triplicado. Cada punto de la recta se preparó igual que la preparación de las muestras del extracto. La lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro UV se leyó a una longitud de onda de 515 nm a los 30 minutos (Figura 7).

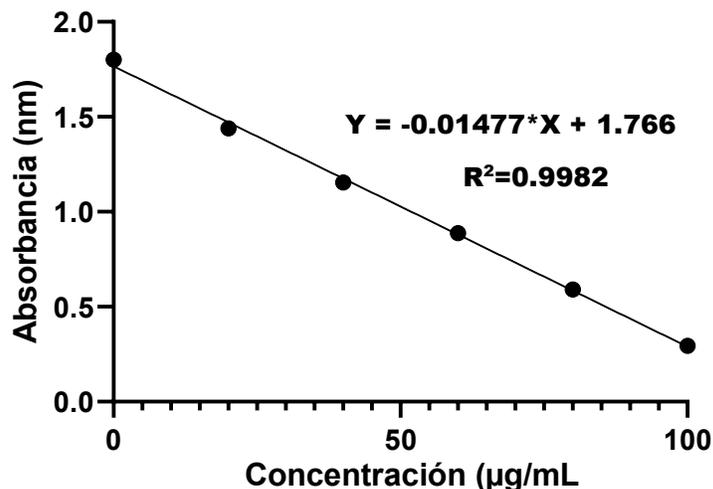


Figura 7. Curva de calibración con ácido ascórbico a los 30 minutos para el método DPPH•.

Los resultados se expresaron como % de Inhibición con la siguiente formula:

$$\% \text{Inhibición DPPH} = \frac{AC - AS}{AC} \times 100$$

Donde:

AC: Absorbancia de la solución de DPPH• control (1.8) (a 734 nm)

AS: Absorbancia de el extracto después del tiempo

3.6.3. Polifenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales, se prepararon los reactivos correspondientes. Carbonato de Sodio (NaCO_3) al 7%, se pesaron 0.7 g de NaCO_3 y se disolvieron en agua destilada a un volumen final de 10 mL en un matraz volumétrico y Folin-Ciocalteu al 10 %, se tomó 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y se disolvieron en 9 mL de agua destilada.

3.6.3.1. Preparación para la curva de calibración

Para la determinación de polifenoles totales se preparó una curva de calibración, donde la solución stock de ácido gálico se pesó 0.1g y se aforo a 10 mL con agua destilada y se prepararon los estándares a concentraciones de 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 $\mu\text{g/mL}$. Cada punto de la recta realizo como la preparación de la medición con el extracto y se dejó reposar 90 minutos y finalmente se leyó a una longitud de onda de 760 nm en espectrofotómetro de luz UV-VIS (Figura 8).

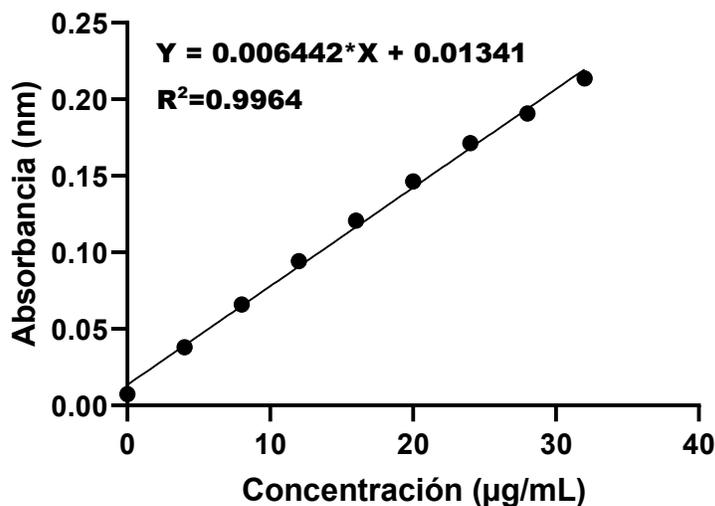


Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de Polifenoles totales.

3.6.3.2. Cuantificación de polifenoles totales

Se tomaron 250 µL de cada uno de los extractos etanólicos de *V. planifolia* y se añadieron 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10 %, se dejó reposar 6 minutos y se añadió 1250 µL de NaCO₃ 7%, seguido de esto se dejó reposar por 90 minutos, y se leyó a una absorbancia de 760 nm.

3.6.4. Flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides se prepararon los siguientes reactivos: Nitrito de sodio (NaNO₂) al 5 %, Cloruro de aluminio al (AlCl₃) al 10 % y NaOH 1M.

3.6.4.1. Preparación para curva de calibración

Se preparo una solución stock de catequina, pesando 10 mg de catequina y aforando a 10 mL con metanol al 80 % en un matraz aforado, a partir de esta concentración se prepararon diferentes concentraciones de: 0, 20, 80, 160, 240, 320 y 400 µg/mL. Cada punto de la recta se preparó como la medición de flavonoides en los extractos y se leyó a una absorbancia de 510 nm en un espectrofotómetro de luz UV-VIS (Figura 9).

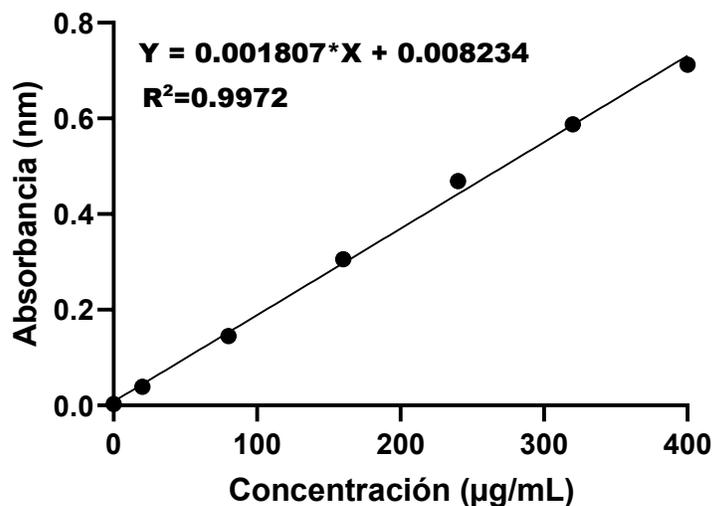


Figura 9. Curva de calibración de catequina para determinación de flavonoides.

3.6.4.2. Cuantificación de Flavonoides

A tubos de ensaye se añadieron 250 µL de muestras de extracto etanólico de hojas y de plántulas de biorreactor de *V. planifolia*, posteriormente se agregaron 75 µL de NaNO₂ y se dejó reposar 6 minutos, seguido de esto se agregaron 150 µL de AlCl₃ 10 % y se dejó reposar 7 minutos, seguido de esto se añadieron 500 µL de NaOH 1M y por último 2025 µL de agua destilada, se leyó a una absorbancia de 510 nm en un espectrofotómetro UV-VIS- Cada medición se realizó por triplicado.

3.7. Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

Para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀), se calculó la ecuación de la recta de la curva de calibración para el método de DPPH•+ y ABTS•+. Para calcular el CI₅₀, se sustituyó la (y) por el 50 en la ecuación, o mediante un análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de DPPH• o porcentaje de inhibición del radical ABTS•+.

$$\text{Ecuación 1)} \quad y = mx + b \quad 50 = mx + b$$

$$\text{Ecuación 2) Al despejar: } x = \frac{50-b}{m}$$

3.8. Prueba de retorcimiento inducido por ácido acético en ratones BALB-C

Este ensayo se llevó a cabo según Koster, (1959), utilizando grupos de ratones BALB-C (n = 8, por grupo), donde se les suministro solución salina por vía oral (grupo vehículo), naproxeno sódico (NPX; 100 mg/kg) (grupo control positivo) o extracto de *V. planifolia* a concentraciones de 10, 100 y 200 mg/kg. Una hora después, se inyectó ácido acético 1 % (10 mg/kg) por vía intraperitoneal a cada animal. A continuación, se les colocó un cilindro de acrílico individualmente y se registró el número de constricciones abdominales durante 30 minutos del grupo tratamiento y control. La experimentación se llevó a cabo bajo la NOM 062-ZOO-1999.

3.9. Prueba de formalina

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología de Hunskaar y Hole (1987). A grupos de ratones (n = 6, por grupo) se les suministro solución salina por vía oral (grupo vehículo), clorhidrato de tramadol (TRD; 30 mg/kg) (control positivo) o extracto de *V. planifolia* a concentraciones de 10, 100 y 200 mg/kg. Después de 1 hora, se les suministro subcutáneamente formalina al 3 % (30 μ L) en el espacio subplantar de la pata trasera derecha y luego se colocaron individualmente en cilindros de plástico. La duración del lamido de la pata se registró de 0 a 15 min (primera fase) y de 15 a 45 min (segunda fase). La experimentación se llevó a cabo bajo la NOM 062-ZOO-1999.

3.10. Dosis Efectiva media (DE₅₀)

Con los resultados obtenidos del extracto etanólico de hojas de *V. planifolia* a las dosis de 10, 100 y 200 mg/kg, se realizó una curva dosis-respuesta con el porcentaje de antinocicepción, realizando una regresión lineal para obtener la dosis

que se requiere para obtener el 50% de la inhibición de dolor, primeramente, se calculó el porcentaje de antinocicepción con la siguiente formula:

Ecuación 3)

$$\% \text{ de Antinocicepción} = 1 - \left(\frac{\text{media de contorciones experimentales}}{\text{media de contorsiones control}} \right) \times 100$$

Ecuación 4) $y = mx + b$ $50 = mx + b$

Ecuación 5) Al despejar: $x = \frac{50-b}{m}$

3.11. Análisis estadístico

Para la micropropagación de plántulas en Sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal, se registraron cuatro variables: número de brotes, altura, número de hojas, número de raíces para cada tratamiento. Para evaluar la normalidad de los datos se realizó prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), para el tratamiento de los datos se realizó una ANOVA de una vía y adicionalmente un análisis de Tukey con una $p < 0.05$ para comparar las medias de los tratamientos. Los datos utilizados fueron la media \pm error estándar de la media (SEM). En cuanto a los análisis de antinocicepción, los datos experimentales se presentaron como media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante análisis unidireccional de diferencia utilizando la prueba de ANOVA y un pos hoc Dunnett para la prueba de ácido acético y una ANOVA de dos vías de múltiples variables con la comparación Dunnett para la prueba de formalina. Valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativo para ambos tratamientos y los datos experimentales se presentaron como media \pm error estándar de la media (SEM).

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 8.0.1.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se analizarán y contextualizarán los resultados obtenidos a lo largo de la investigación. Se examinarán los datos relacionados con los métodos de conservación de *V. planifolia*, la eficiencia de las técnicas de propagación *in vitro*, y la producción de biomasa en diferentes sistemas de cultivo. Además, se discutirá la actividad medicinal de los extractos de *V. planifolia*, particularmente sus efectos antioxidantes y antinociceptivos. Los resultados se comparan con estudios previos de la literatura para evaluar su relevancia y se identifican las implicaciones prácticas de estos resultados para la conservación y utilización de la vainilla.

4.1. Propagación de *V. planifolia* en Biorreactores de Inmersión temporal

La importancia del uso de sistemas de inmersión temporal en la micropropagación *in vitro* radica en aumentar la producción de las plántulas, lo que garantizará obtención de material vegetal en menos tiempo, sin embargo, el uso de esta técnica no sustituye la multiplicación tradicional *in vitro*, debido a que siempre será necesario para la etapa previa en caso de multiplicación de explantes, como en el caso de esta investigación.

El crecimiento y desarrollo vegetal en sistema de inmersión temporal se puede controlar modificando el tiempo y frecuencia de inmersión de las plántulas (Jäger *et al.*, 1993; Cabrera *et al.*, 2011), dado que el funcionamiento de este sistema consiste en la inyección de aire a presión al recipiente, provocando la elevación del medio de cultivo rico, ocasionando el contacto de las vitroplantas con el medio de cultivo por el tiempo programado intermitentemente. Una vez terminado el tiempo programado de inyección de aire el medio desciende por gravedad y el ciclo comienza de nuevo. Dichas condiciones fueron estandarizadas en este proyecto.

El sistema de inmersión utilizado en este experimento es una patente mexicana llamada InvitroOrquid®, que emplea biorreactores tipo frascos gemelos. Para determinar la frecuencia de inmersión más adecuada en el sistema de inmersión

temporal (Figura 10), se realizaron pruebas con inmersiones de 2 minutos cada 4, 8 y 12 horas. Se evaluó la altura de las plántulas de *V. planifolia* y de los brotes, obteniéndose medias de 0.4 ± 0.03 cm, 0.2 ± 0.02 cm y 0.2 ± 0.02 cm, respectivamente (Figura 10A). Además, se midió la altura de los nuevos brotes a las mismas frecuencias, resultando en medias de 0.70 ± 0.08 cm, 0.35 ± 0.04 cm y 0.27 ± 0.03 cm, respectivamente. Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Figura 10B).

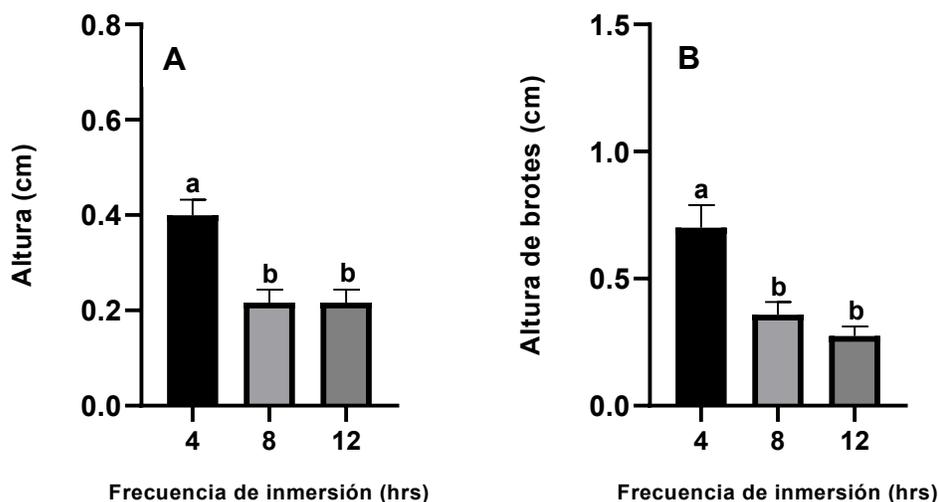


Figura 10. Evaluación de frecuencia de inmersión en vitroplantas de *V. planifolia*. A) Altura de las vitroplantas. B) Altura de brotes. Las barras representan el promedio de los datos ($n=30$) ($p < 0.05$).

La frecuencia de inmersión es crucial, ya que determina el intervalo de tiempo que las plántulas pasan antes de ser sumergidas nuevamente en el medio de cultivo. Este factor, junto con el tiempo de inmersión, es fundamental para una propagación vegetal exitosa, ya que afecta la absorción de nutrientes, la tasa de respiración de los tejidos vegetales, la oxidación y la peroxidación de lípidos. Según Martre *et al.* (2001), el tiempo de inmersión también puede inducir estrés oxidativo. Sin embargo, una regulación inadecuada puede provocar hiperhidricidad o vitrificación en los explantes, una alteración que da a las plántulas un aspecto vidrioso debido a la

acumulación excesiva de agua apoplástica, reduce la síntesis de lignina y puede inducir necrosis (Berthouly y Etienne, 2005).

La mayoría de las investigaciones sobre la multiplicación de *V. planifolia* en sistemas de inmersión temporal utilizaron una frecuencia de inmersión de 4 horas, empleando diversos segmentos vegetales como ápices y raíces (González, 2003), segmentos nodales, "clusters" (Ramos-Castellá *et al.*, 2014; Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016), y yemas (Spinoso, 2017). En cuanto a la altura de las vitroplantas de *V. planifolia* la mejor frecuencia de inmersión fue a las 4 h obteniendo un promedio de 0.4 ± 0.03 cm a los 15 días, Ramírez-Mosqueda y Bello-Bello (2021), multiplicaron explantes de *V. planifolia* de 2 cm en biorreactor SETIS™ a una frecuencia de 2 minutos cada 4 horas, obteniendo un mejor rendimiento que nuestro sistema de inmersión temporal con una longitud de explante de 4.24 ± 0.16 a los 30 días de exposición, sin embargo el medio de cultivo fue suplementado con reguladores de crecimiento. Por otro lado, Tirado *et al.* (2005), multiplico protocormos una orquídea de la especie *Phanelpsis* en biorreactores RITA®, utilizando la misma frecuencia de inmersión y el tiempo de inmersión que el utilizado en esta investigación, obteniendo una mejor tasa de multiplicación y estos parámetros evitaron la vitrificación en las los protocormos. Así mismo, Bonilla *et al.* (2020), en biorreactores BIT®, multiplico plántulas de la orquídea *Guarianthe skinneri*, utilizando diferentes tiempos de inmersión, donde el mejor resultado lo obtuvo a una frecuencia de inmersión de cada 24 horas por 7 minutos, obteniendo una altura de 6.7 cm de altura a los 30 días de cultivo.

Respecto a la longitud de brotes de la misma manera a las 4 h de frecuencia de inmersión se obtuvieron los mejores resultados con una media de 0.70 ± 0.08 cm a los 15 días con medio MS suplementado con sacarosa (Figura 10B), por otro lado, en la investigación de Ramos-Castellá *et al.* (2014), alcanzaron una longitud de brotes de 13.50 ± 0.88 cm con el mismo tiempo de inmersión y frecuencia, con una exposición de 30 días, además con medio suplementado con reguladores de

crecimiento, lo que sugiere un mayor aprovechamiento de nutrientes por parte de las plántulas.

Una vez elegida la frecuencia y tiempo de inmersión se decidió probar diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento para observar el comportamiento de las plántulas de *V. planifolia* en relación a la producción de biomasa en el sistema de inmersión temporal, contra el medio semisólido el cual es el sistema tradicional de micropropagación vegetal tomándolo como un control, con la finalidad de evaluar el sistema de inmersión temporal y la mejor combinación de reguladores de crecimiento, para aumentar la tasa de multiplicación y la disminución de costos en la producción vegetal de *V. planifolia* evaluando altura, altura de brotes, número de hojas, número de raíces y número de brotes de cada sistema.

El uso de reguladores de crecimiento permite un mayor desarrollo vegetal alternativo de acuerdo con el grado de morfogénesis las plantas presentan división y elongación celular, sin embargo, especialmente en los sistemas *in vitro* se ha observado que la adición de reguladores de crecimiento aumenta el nivel de elementos xilémicos o diversos cambios a nivel tisular. La regulación de citocinas y auxinas permite el desarrollo óptimo, estimulando el crecimiento adecuado de las plantas de acuerdo con las secciones vegetales que se requiera obtener, por lo que, la adición de citocinas a los medios de cultivo aumenta el número de brotes y la elongación vegetal y la adición de auxinas estimula el crecimiento radicular (Jordán y Casaretto, 2006).

El primer parámetro evaluado en las vitroplantas de *V. planifolia* fue la altura, donde se obtuvo un promedio de 1.22 ± 0.05 cm, significativamente mayor que el control, que presentó 0.66 ± 0.05 cm. Además, se midió la altura de los brotes nuevos, observándose un promedio de 1.48 ± 0.04 y el control 0.57 ± 0.03 . Estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Figura 11).

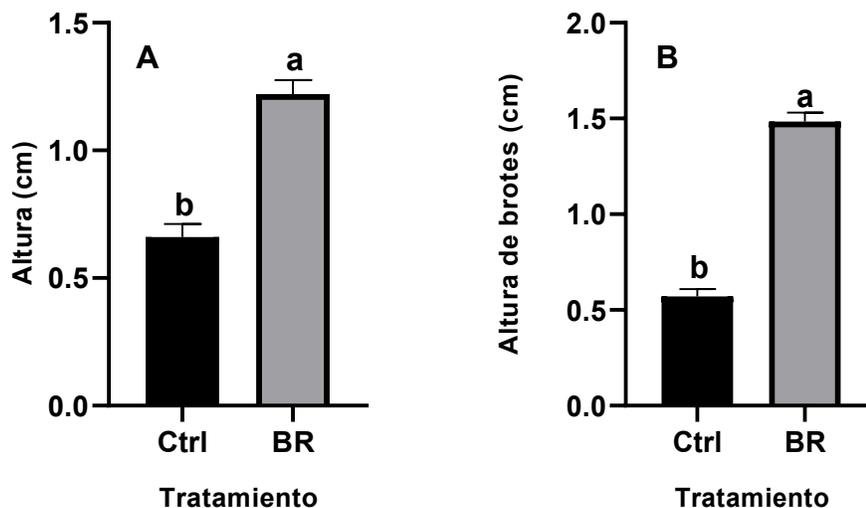


Figura 11. Evaluación de altura y altura de brotes sobre el T1 (BAP 3 ppm + AIA 1.5 ppm + ácido ascórbico 150 mg/L. A). Altura de plántulas. B) Altura de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El T1 (BAP 3 ppm + AIA 1.5 ppm + ácido ascórbico 150 mg/L) en sistema de inmersión temporal mostró una mayor respuesta en cuanto a la elongación vegetal que el medio semisólido (control) (Figura 11A), lo que demuestra la eficacia del sistema contra el sistema tradicional. Además, el hecho que el medio contenga ácido indol acético (AIA) y 6-Bencilaminopurina (BAP), concuerda con lo mencionado por Bidwel (2004), quien describió que en el medio de cultivo que contenía auxinas y citocininas, se observaba una división celular mediada por las citocininas, por lo que, el balance adecuado de auxinas y citocininas es muy relevante en la elongación vegetal y crecimiento por división celular.

Ramírez Mosqueda y Bello-Bello (2021) propagaron *V. planifolia* en un sistema de inmersión temporal (SETIS) y compararon los resultados con el sistema semisólido utilizando la fitohormona BAP en ambos casos encontraron que el sistema de inmersión temporal mostró mejores resultados en la elongación vegetal, con un crecimiento de brotes de 2.61 ± 0.21 cm, lo que demuestra que este sistema permite un mejor aprovechamiento de los PGR añadidos, con un incremento del 50% en

comparación con el sistema semisólido. Otros autores, como Kunakhonnuruk *et al.* (2019), han multiplicado orquídeas como *Epipactis flava* Seidenf. utilizando el sistema de inmersión temporal, obteniendo una altura de 29.4 ± 0.8 mm.

En cuanto a la altura de brotes el resultado fue similar al obtenido por Iglesias-Andreu (2014), donde multiplico *V. planifolia* en biorreactores de inmersión temporal y obtuvo una longitud de brotes de 1.45 ± 0.07 cm, una medida ligeramente por debajo de la obtenida en esta investigación, por otro lado, Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016), también multiplicaron *V. planifolia* pero en diferentes sistemas de inmersión temporal utilizando medio MS como medio de cultivo suplementado con $9.55 \mu\text{M}$ de benciladenina (BA) como citocinina, 150 mg/L de ácido ascórbico, 35 mg/L de clorhidrato de cisteína y 100 mL/L de CW, a una frecuencia de 2 minutos por 4 horas durante 6 semanas, en donde se obtuvieron los siguientes resultados para biorreactor RITA® 1.69 ± 0.09 cm, BIT® 1.33 ± 0.10 cm y BIG 1.44 ± 0.19 , resultados similares a los obtenidos en esta investigación con 1.48 ± 0.04 cm al mismo tiempo de exposición, siendo mayor que los sistemas BIT® y BIG sin reportar oxidación. El uso de ácido ascórbico es un antioxidante que se utiliza en plantas y evitar la oxidación vegetal dado que estabiliza los radicales libres y previene el daño celular a través de la absorción de hierro, además promueve la cicatrización de heridas y cortes en la superficie de las plantas (Demigne *et al.*, 2004).



Figura 12. Plántulas de *V. planifolia* en biorreactor de inmersión temporal.

La selección de tipos de reguladores de crecimiento vegetal (PGR) y el sistema de cultivo que se utilizan en la propagación *in vitro* son factores importantes que considerar, ya que las plantas naturalmente sintetizan los PGR, sin embargo, para un mayor crecimiento y mayor producción de moléculas bioactivas, es esencial añadir reguladores de crecimiento de crecimiento externas (Singh, 2018). Las citocininas y las auxinas juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas en sistemas *in vitro* (Nowakowska *et al.*, 2019) porque regulan los procesos fisiológicos de las plantas actuando de manera antagónica o sinérgica (Danilova *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el crecimiento y desarrollo vegetal de meristemas y brotes, además de diferenciación celular, estos sucesos están modulados por el antagonismo que ocurre entre las auxinas y las citocininas, por el contrario del crecimiento o elongación vegetal que pueden estar regulados por aportes sinérgicos entre estos mismos PGR (Yang *et al.*, 2017).

Otras de las variables evaluadas en el primer tratamiento fueron el número de hojas, número de raíces y número de brotes las cuales se muestran en la Figura 13, donde se observa que el Tratamiento 1 (T1) (BAP 3 ppm + AIA 1.5 ppm + ácido ascórbico 150 mg/L), alcanzó un resultado superior al del control, en cuanto al número de hojas se obtuvieron 7.66 ± 0.88 hojas y en el control 4.0 ± 0.57 , en el número de raíces 7.33 ± 0.66 y en el control 3.33 ± 0.88 , número de brotes con 8.66 ± 0.33 brotes y en el control la cantidad de 4.33 ± 0.66 , los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

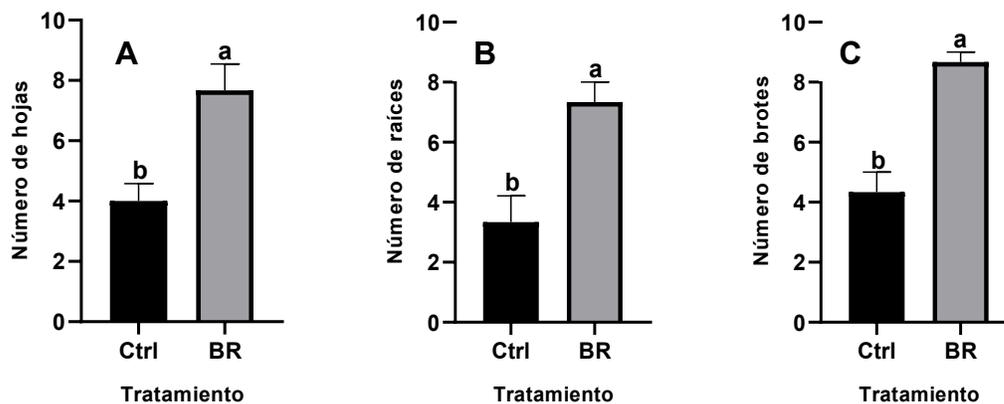


Figura 13. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de *V. planifolia* T1. **A)** Número de hojas. **B)** Número de raíces. **C)** Número de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) ($p < 0.05$).

En la Figura 13 se muestra que el tratamiento 1 (T1) favoreció significativamente el número de hojas, brotes y raíces. Autores como Ramos-Castellá *et al.* (2014), al propagar *V. planifolia* en el sistema de inmersión temporal RITA® con diferentes tiempos de inmersión, incluyendo 2 minutos cada 4 horas, lograron obtener un promedio de 1.67 ± 0.16 hojas. En contraste, en esta investigación se obtuvo un promedio de 7.66 ± 0.88 hojas, lo que representa un incremento de hasta un 400%. Por otro lado, Ramírez-Mosqueda *et al.* (2021), propagaron explantes de *V. planifolia* en biorreactores de inmersión temporal, evaluando el experimento durante 4 semanas y obtuvieron un promedio de 3.72 ± 0.23 hojas, un resultado inferior al obtenido en esta investigación. Otra variable evaluada fue el número de raíces (Figura 13B), donde de la misma manera, se alcanzaron mejores resultados que el control, donde se obtuvo un promedio de 7.33 ± 0.66 raíces y en el control 3.33 ± 0.88 , lo que demuestra que con el uso de biorreactores de inmersión temporal se produce el doble de raíces que con el medio tradicional (cultivo semi sólido). Villegas-Ramírez y Palma Zúñiga (2022), multiplicaron en Biorreactor *V. planifolia*, y de la misma manera obtuvieron mayores resultados en el sistema de inmersión temporal (medio líquido) contra el medio semi sólido.

En cuanto al número de brotes (Figura 13C), se obtuvo casi el doble de brotes que el control. Iglesias-Andreu (2014) multiplicó *V. planifolia* y en el número de brotes obtuvo 12.04 ± 0.48 brotes y en medio semi sólido obtuvo 7.11 ± 0.31 brotes, al añadir 2 mg/L de BA en el medio de cultivo, resultados superiores a los encontrados en esta investigación, por otro lado, Ramírez-Mosqueda y Iglesias-Andreu (2016), multiplicaron explantes de *V. planifolia* en diferentes tipos de biorreactores añadiendo al medio de cultivo 50 mg/L de clorhidrato de cisteína y 100 mg/L de ácido ascórbico y el mayor número de brotes/explantes fue de 18.37 brotes en el biorreactor BIT®, seguido de RITA® con 12.62 brotes, obteniendo resultados superiores hasta en un 50 %, esto debido a la composición del medio a la autonomía de los biorreactores de patente utilizados, sin embargo, obtuvieron brotes más largos de 1.67 cm en el biorreactor RITA® en comparación con el BIT® con 1.43 cm y la longitud de brotes de esta investigación alcanzó los de 1.48 ± 0.04 cm como se muestra en la Figura 13B siendo mayor que la longitud de los brotes el sistema BIT®.

Para la evaluación del tratamiento 2 (T2) (BAP 2.5ppm + ANA 1ppm), el primer parámetro evaluado fue la altura de los explantes, donde en medio líquido en el sistema de inmersión temporal se obtuvo un crecimiento de 1.10 ± 0.06 cm y el control el cual consistió en medio semisólido fue de 0.50 ± 0.02 cm, seguido de la altura de brotes donde se obtuvo una altura 1.3 ± 0.05 cm y el control de 0.44 ± 0.04 cm (Figura 14). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

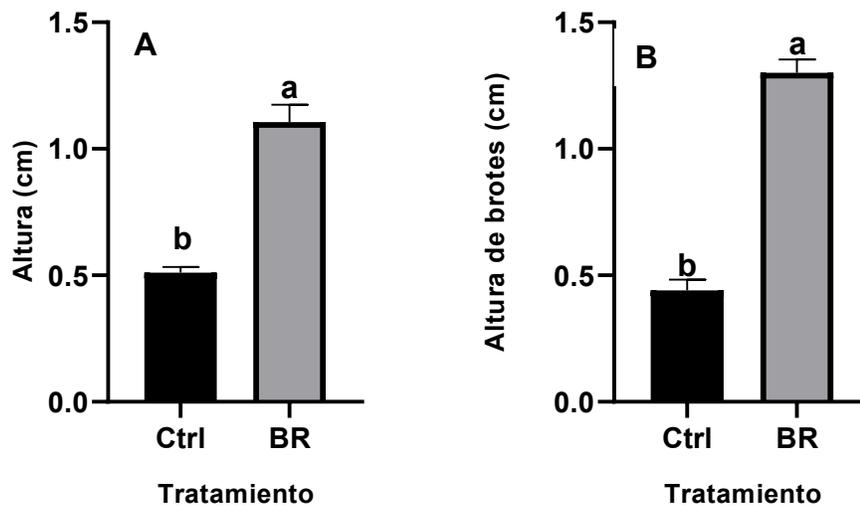


Figura 14. Evaluación de altura y altura de brotes de plántulas de *V. planifolia* sobre el T2 (BAP 2.5ppm + ANA 1ppm). **A)** Altura de plántulas. **B)** Altura de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el Tratamiento 2 (T2) se obtuvieron resultados superiores a los del sistema semi sólido. Los sistemas de inmersión temporal no solo han sido utilizados en plantas de la familia Orchideaceae, sino también en plantas de agricultura y ornamento, como Llanos Buendía (2015), quien propagó piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill Var. MD2) en biorreactores de inmersión temporal añadiendo al medio basal 2.1 mg/L de BAP y 0.3 mg/L de ANA obteniendo una altura de 1.58 cm, resultado muy similar al conseguido en esta investigación, sin embargo, los tiempos de inmersión de esta fruta tropical fueron de 3 minutos cada 3 horas por un periodo de 6 a 8 meses. Vázquez-Cisneros (2014) reprodujo el árbol caducifolio *Bursera linanoe*, utilizando 0.027 μM de ANA y 0.022 μM de BAP en biorreactores RITA[®] con 1 minuto cada 4 horas para la producción de embriones somáticos, produciendo hasta 922.9 embriones. Los PGR poseen un papel importante en los procesos fisiológicos de las plantas, en el caso de las auxinas, estas participan en el crecimiento de las plantas, dando respuestas en la fisiología como en elongación vegetal y división celular (Fichet, 2017), en el caso de este tratamiento se colocó una hormona Ácido

naftalacetico (ANA), la cual es una auxina que no se produce en las plantas es decir es sintética.

En cuanto a la altura de brotes, el tratamiento implementado en este experimento y en combinación con el biorreactor, obtuvo resultados favorables (Figura 14B), concordando en el uso de esta fitohormona con la investigación de Amasifuén Alvarado (2019), donde propagó *Sacha Inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) en sistema de inmersión temporal y al añadir 0.045 µM de BAP se observó una altura de brotes de 3.41 cm. Otra planta que ha sido multiplicada en sistema de inmersión temporal es *Agave tobalá* (*Agave potatorum* Zucc), a una frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 12 horas donde se obtuvo una mejor altura de brote por explante con una longitud promedio de brotes de 2.01 cm con 3.0 mg/L de BAP y adicionado con 3.0 mg/L AIA a los 30 días de monitoreo (Correa Hernández, 2021).

Las siguientes variables que se evaluaron en el tratamiento 2 (T2) (BAP 2.5ppm + ANA 1ppm), fueron el número de hojas donde se obtuvieron 4.0 ± 0.57 hojas y el control 3.0 ± 0.57 hojas, numero de raíces 5.0 ± 0.57 raíces y el control 2.0 ± 0.57 raíces y el número de brotes 7.0 ± 0.57 brotes y el control con 3.66 ± 0.33 brotes (Figura 15). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

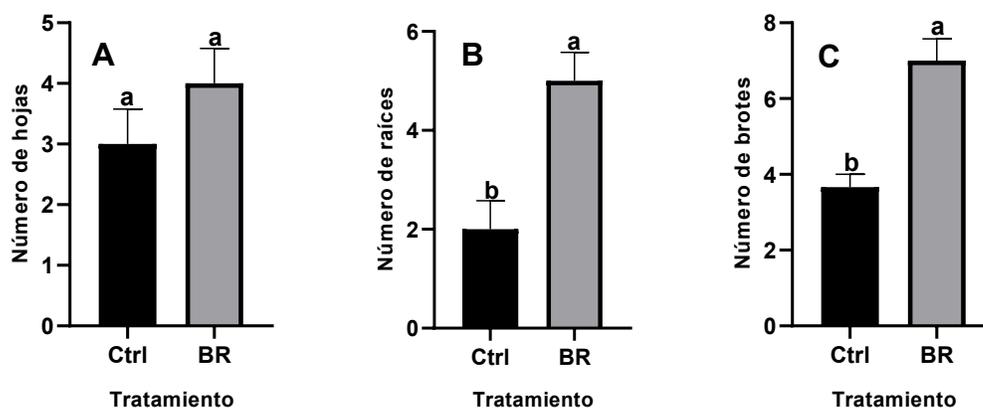


Figura 15. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de *V. planifolia* T2. **A)** Número de hojas. **B)** Número de raíces. **C)** Numero de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) ($p < 0.05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación con el número de hojas de *V. planifolia*, se observó que se obtuvieron un mayor número de hojas con el sistema de inmersión temporal que en el sistema semisólido a los 45 días. Estos resultados demuestran nuevamente la eficacia del sistema de inmersión temporal en comparación con el sistema semisólido. Además, concuerdan con el estudio de Rodríguez Mendoza (2018), quien multiplicó esquejes de papa (*Solanum tuberosum* L.) utilizando el sistema de inmersión temporal. En su investigación, añadió al medio de cultivo 0.20 mg/L de ácido giberélico (GA₃) y 0.50 mg/L de BAP, logrando obtener 7.32 ± 0.32 hojas a los 30 días. La combinación de diferentes PGR, ya sean naturales o sintéticas, es crucial para la multiplicación *in vitro*, dado que puede influir en el crecimiento de la planta. Además, factores como la capacidad de las plántulas para metabolizar o aprovechar los nutrientes adicionados, así como el tipo de explante y de planta, también son relevantes en este proceso. En cuanto al número de raíces el sistema de inmersión temporal obtuvo mejores resultados que el medio semisólido (Figura 15B). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Sarria (2022), quien también empleó una combinación similar de PGR, multiplicando caña de azúcar utilizando el sistema de inmersión temporal y obtuvo resultados positivos en el enraizamiento, con esquejes capaces de producir hasta 11.13 ± 1.14 raíces cuando se añadieron 5 mg/L de ANA al medio de cultivo. Los cuales superan a los obtenidos en esta investigación. Por otro lado, Villegas (2018), al multiplicar plántulas de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe), utilizó 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BA. Aunque no se observaron diferencias significativas en el número de raíces, sí se registraron diferencias en la longitud de estas, con 4.0 cm en el sistema de inmersión y 1.7 cm en el sistema semisólido.

En cuanto al número de brotes nuevamente el sistema de inmersión temporal obtuvo resultados superiores al sistema semisólido (Figura 15C). Amasifuén Alvarado (2019), propagó *Sacha Inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) en sistema de inmersión temporal y al añadir 0.45 μ M de BAP, obtuvo 5.27 brotes, resultado inferior al obtenido en esta investigación. Otros autores como Olivera-Gonzales *et*

al. (2017), utilizaron esta combinación de PGR para el establecimiento de yemas en medio semisólido de *Perezia pinnatifida* (Humb. & Bonpl.) Wedd, añadiendo 1.0 mg/L de BAP y 0.01 mg/L de ANA y obtuvieron aproximadamente 2 brotes, en cambio al añadir solo 1.0 mg/L de BAP las plántulas alcanzaron a producir aproximadamente 6 brotes, debido a que la adición de citocininas al medio de cultivo, activan la producción de yemas axilares y de brotes (Aremu *et al.* 2016). De la misma manera, Magaña *et al.* (2019), multiplicó *Anthurium andreanum* L. en biorreactores de inmersión temporal (RITA®), y al comparar con el medio semisólido los resultados coinciden con esta investigación, donde el sistema de inmersión obtuvo resultados superiores a los del medio semisólido, añadiendo 2.0 mg/L de BAP en medio semisólido se produjeron 3.8 brotes y en medio líquido 24.2 brotes siendo 6.3 veces mayor a las 12 semanas de exposición, con el uso de estos sistemas debido al tipo de aireación al que se exponen las plántulas impacta positivamente en la multiplicación y sobre todo en la sobrevivencia en la última fase de la micropropagación *in vitro* (Texeira *et al.*, 2005).

En el tratamiento 3 (T3) el cual consistió en BAP 2.5 ppm y AIB 1.5 ppm, de la misma manera se evaluaron las variables altura y altura de brotes, donde en altura se obtuvo 1.63 ± 0.06 cm y el control 0.66 ± 0.04 cm y en la altura de brotes se observó una altura de 1.16 ± 0.09 cm y el control de 0.75 ± 0.10 cm (Figura 16). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

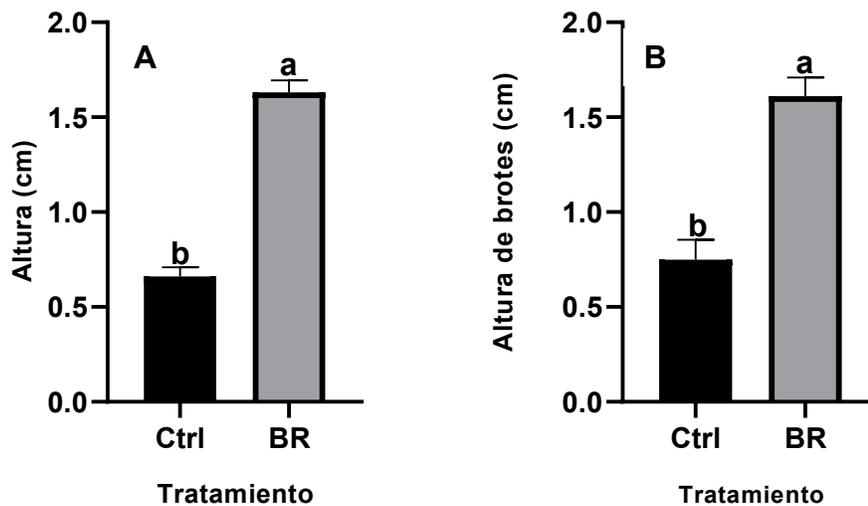


Figura 16. Evaluación de altura y altura de brotes de plántulas de *V. planifolia* sobre el T3 (BAP 2.5 ppm + AIB 1.5 ppm). A) Altura de plántulas. B) Altura de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto a la altura en plantas de *V. planifolia* fueron de 1.63 ± 0.06 cm y el control 0.66 ± 0.04 cm, observando que en cuestión de altura el biorreactor logro superar a los T1 y T2 (Figura 16A); Patiño Troncos (2023), multiplico plántulas de banano (*Musa acuminata* aaa) en biorreactores RITA,[®] añadió al medio liquido 5.0 mg/L BAP+ 5.0 mg/L AIB y obtuvo una altura de 3.06 cm resultado superior al obtenido en esta investigación, esto puede atribuir a que se añadió al medio de cultivo el doble de BAP y el triple de AIB. AIB es una hormona del tipo auxina que se encarga de la promoción de crecimiento en las plantas, y es mayormente utilizado para la propagación de esquejes y yemas para la producción de raíces laterales, por otro lado, promueve la absorción de nutrientes y acelera las funciones metabólicas (Intercontinental Import Export, 2010).

Por otro lado, también se cuantificó la altura de los brotes (Figura 16B), Ugsha Chaluiza (2022), al propagar frambuesa (*Rubus idaeus*) *in vitro* en medio semisólido al añadir la combinación de reguladores de crecimiento BAP y GA₃, obtuvo 1.16 cm en la altura de brote, mismo resultado al obtenido en esta investigación, incluso aun siendo un sistema diferente, esto debido a la adición de esta giberelina bioactiva, ya que esta hormona vegetal estimula el crecimiento de las plantas, además de promover la conversión de brotes a tallos y la división mitótica de las hojas (Paredes, 2009).

En la evaluación de las demás variables del Tratamiento 3 (T3) (BAP 2.5 ppm + AIB 1.5 ppm), al cuantificar el número de hojas de las vitroplantas de *V. planifolia* se observó que se obtuvieron 4.0 ± 0.57 hojas y control de 2.33 ± 0.33 hojas, en cuanto al número de raíces se lograron 8.0 ± 0.57 raíces y el control 3.0 ± 1.0 raíces, por último, en el número de brotes, se cuantificaron 8.0 ± 0.57 brotes y el control 5.0 ± 0.57 brotes (Figura 17).

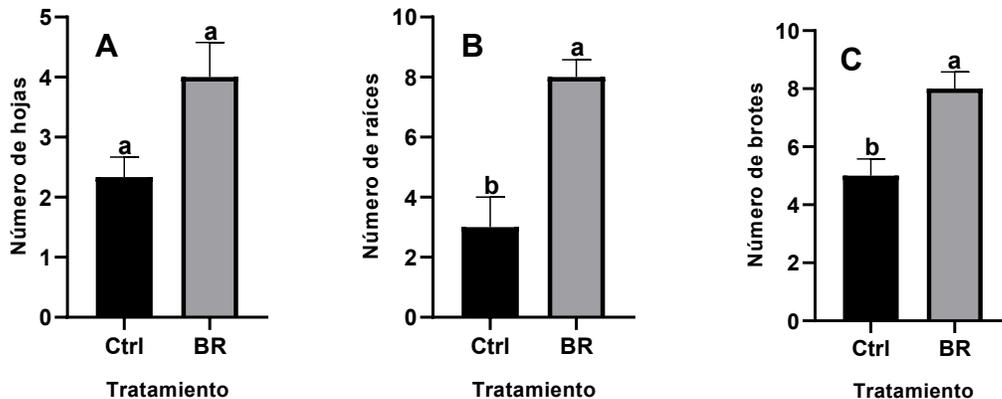


Figura 17. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de *V. planifolia* T3. **A)** Número de hojas. **B)** Número de raíces. **C)** Número de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) ($p < 0.05$).

En la Figura 17A, se obtuvieron 4.0 ± 0.57 hojas y control de 2.33 ± 0.33 hojas, resultado inferior al T1, sin embargo, este tratamiento si tuvo diferencias significativas con el control, a diferencia del T2, por lo que al añadir esta combinación de PGR fue exitosa en el sistema de inmersión temporal. González

Castillo y Chavarría Reyes (2016), al multiplicar plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.), añadieron 0.20 mg/L de GA₃ y 1.00 mg/L de BAP y lograron cuantificar 9.15 hojas y al cambiar la dosis 0.10 mg/L de GA₃ y 0.50 mg/L de BAP, cuantificaron 3.07 brotes, por otro lado, Palhares *et al.* (2004), multiplicaron plantas de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*), en biorreactores de inmersión temporal y añadieron 0.5 mg/L de AIB y 1.0 mg/L de MH5 un análogo de brasinoesteroides y obtuvieron 10.28 hojas y al añadir solo los 0.5 mg/L de AIB se obtuvieron 9.52 hojas.

En cuanto al número de raíces lograron 8.0 ± 0.57 raíces en medio líquido y el control 3.0 ± 1.0 raíces en medio semi sólido (Figura 17B). González (2015), micropropagación de *Agave tequilana* Weber Variedad Azul “El coronel” en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT), micropropago en sistema de inmersión temporal *Agave tequilana* Weber Variedad Azul y al añadir 0.525 mg/L de AIB y 0.525 mg/L de 2iP), el cual generó un mayor desarrollo de puntas y raíces. Tejada Alvarado *et al.* (2019), multiplico *in vitro* utilizando microtallos de arándano (Bluecrop, Legacy, Star y Biloxi), los cuales se sometieron a una concentración de 200 mg/L o 100 mg/L de AIB, obteniendo hasta 5 raíces por planta, de la misma manera Kouakou *et al.* (2017), en sistema semisólido multiplico Anacardo (*Anacardium occidentale* L.) y al añadir 22.5 mg/L de AIB las plántulas produjeron más de 10 raíces por explante.

Otra variable que se evaluó fue el número de brotes (Figura 17C), donde los resultaron 8.0 ± 0.57 brotes y el control 5.0 ± 0.57 brotes con la combinación de reguladores de crecimiento utilizadas. Vega Cervantes (2020), al propagar Agrillo (*Rhus allophylloides*) en biorreactores de inmersión temporal y agregando 1 mg/L de BAP al medio líquido hubo una brotación de 2.83 brotes, mientras que al añadir AIB combinado con BAP como en esta investigación no resultaron favorables para inducción de brotes, sin embargo, al añadir 0.5 mg/L el AIB indujo la promoción de raíces, aunque según las investigaciones de otros autores la adición de AIB al medio de cultivo no favorece el crecimiento o elongación vegetal de manera pronunciada, en esta investigación si se vio beneficiado el número de brotes a comparación de

los tratamientos T1 y T2, esto coincide con Budău *et al.* (2023), que al multiplicar *Robinia pseudoacacia* L. en medio semisólido Driver y Kuniyuki Woody (DKW), en presencia de 0.5 mg/L de BAP y 0,04 mg/L de AIB, casi el 100 % de los explantes obtuvieron de 4.45 ± 0.18 brotes, resultado similar al control de este proyecto el cual es semisólido.

Para la valoración del último tratamiento (T4), compuesto de 3 ppm de BAP, CW 10% y 150 mg/L ácido ascórbico, donde se evaluaron las mismas variables de los tratamientos anteriores, obteniendo una altura de 0.89 ± 0.07 cm 0.33 ± 0.04 cm control, altura de brotes 1.05 ± 0.07 cm y el control de 0.44 ± 0.06 cm (Figura 18). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

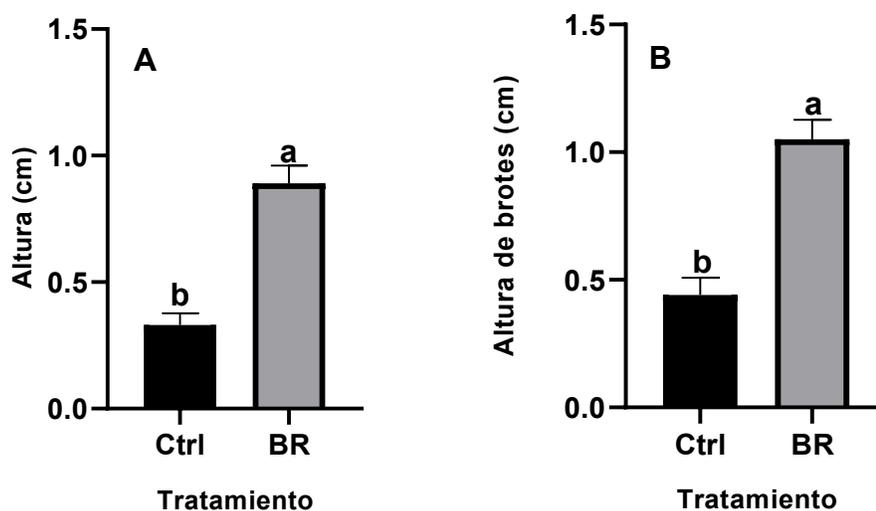


Figura 18. Evaluación de altura y altura de brotes de plántulas de *V. planifolia* sobre el T4 (BAP 3ppm + CW 10% + ácido ascórbico 150 mg/L). **A)** Altura de plántulas. **B)** Altura de brotes. Las barras representan el promedio de los datos ($n=30$) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La utilidad de los sustratos orgánicos naturales en la micropropagación *in vitro* es algo ampliamente demostrado, debido a que se ha descrito que estos pueden mejorar el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales, tales como jugo de manzana, tomate, plátano, papa, jugo de piña, extracto de maíz y agua de coco,

además de ser una alternativa eficaz y económica (Gupta, 2016; Kaur y Bhutani, 2016).

En los resultados mostrados en la Figura 18A, se encontró una altura en las plántulas de *V. planifolia* de 0.89 ± 0.07 cm y 0.33 ± 0.04 cm control. Utami y Hariyanto (2019), reportaron que en *Phalaenopsis amboinensis*, cuando se añadió CW al 15% (v/v) junto con homogeneizado de plátano (10 g/L) al medio VW, las plántulas alcanzaron una longitud de 6.2 ± 0.13 cm, mostrando resultados mejores a los obtenidos en esta investigación. Por otro lado, Carranza Álvarez *et al.* (2021), al germinar *V. planifolia* en medio semisólido, añadieron 30 mL de CW al medio de cultivo a una exposición de 60 días, al medir la altura de brotes de los protocormos se cuantificó una altura de 35.1 ± 18.8 mm, resultado superior al obtenido en esta investigación; esto podría ser por el tipo de medio de cultivo utilizado, el porcentaje de CW adicionada o el tiempo de exposición de las plántulas al medio de cultivo, sin embargo los resultados del sustrato natural se ven favorecidos en las siguientes variables ya que el agua de coco (CW) contiene azúcares solubles, iones inorgánicos. como fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro y manganeso, vitaminas solubles en agua como tiamina, riboflavina, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y reguladores del crecimiento vegetal como auxinas y citoquinina, debido a la presencia de tantos componentes importantes, CW ha demostrado ser un excelente promotor del crecimiento (Utami *et al.*, 2015).

Al añadir un PGR al medio de cultivo y sustratos orgánicos naturales como alternativa más económica se cuantificó una altura de brotes de 1.05 ± 0.07 cm y el control de 0.44 ± 0.06 cm en el tratamiento 4 (T4) (Figura 18B), la adición de sustratos naturales también fue efectivo en Peña-Ramírez *et al.* (2010), quien multiplico cedro rojo (*Cedrela odorata*) en sistema de biorreactores de inmersión temporal y agregar 20 % de CW , GA3, menciona incremento 3.5 veces la elongación de brotes y 4 veces la elongación de raíces. Por otro lado, Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016), también multiplicaron *V. planifolia*, pero en diferentes sistemas de inmersión temporal utilizando medio MS como medio de

cultivo suplementado con 9.55 μM de Benciladenina (BA) como citocinina, 150 mg/L de ácido ascórbico, 35 mg/L de clorhidrato de cisteína y 100 mL/L de CW, obteniendo el mayor resultado en biorreactor RITA[®], cuantificando una altura de brotes de 1.69 ± 0.09 cm.

Para evitar el estrés oxidativo en las plántulas de *V. planifolia* se le añadió al medio de cultivo 150 mg/L de ácido ascórbico, lo que concuerda con Sota *et al.* (2021), quien menciona que al añadir 100 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico al medio de cultivo disminuyó el estrés oxidativo, ya que esto puede disminuir su crecimiento por la acumulación de sustancias tóxicas, ya que las primeras horas 24-48 h del cultivo *in vitro* son críticas, así mismo Martínez-Oviedo *et al.* (2024), sometieron los segmentos nodales de *Arrabidaea chica* a hipoclorito de sodio (0%; 2,5% y 5,0%) y en el medio MS 0.15 g/L de ácido ascórbico y 0.1 g/L de ácido cítrico solos y combinados para la prevención de la oxidación vegetal de en condiciones *in vitro*. El uso de antioxidantes como el ácido ascórbico es muy común en los medios de cultivo *in vitro*, autores como: Leal-García *et al.* (2022), establecieron un Sistema de Inmersión Temporal (SIT), de *Coffea Arabica* donde sometieron las semillas en una solución con 0.1 g/L de ácido ascórbico y 0.15 g/L de ácido cítrico durante 1 min y se transfirieron a los sistemas *in vitro*. Por lo que el estrés oxidativo en plantas *in vitro* es un parámetro importante para la sobrevivencia de las plántulas *in vitro* debido a la producción de metabolitos oxidativos y al estrés vegetal.

Por último las variables que se evaluaron en el tratamiento 4 (T4) compuesto de 3 ppm de BAP, CW 10% y 150 mg/L ácido ascórbico, fueron el número de hojas, número de raíces y número de brotes, cuantificando lo siguiente: 3.33 ± 0.33 hojas y el control 1.66 ± 0.66 hojas, 4.33 ± 0.33 raíces y el control de 1.16 ± 0.33 raíces y 6.33 ± 0.88 brotes y el control de 2.66 ± 0.33 brotes (Figura 19). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

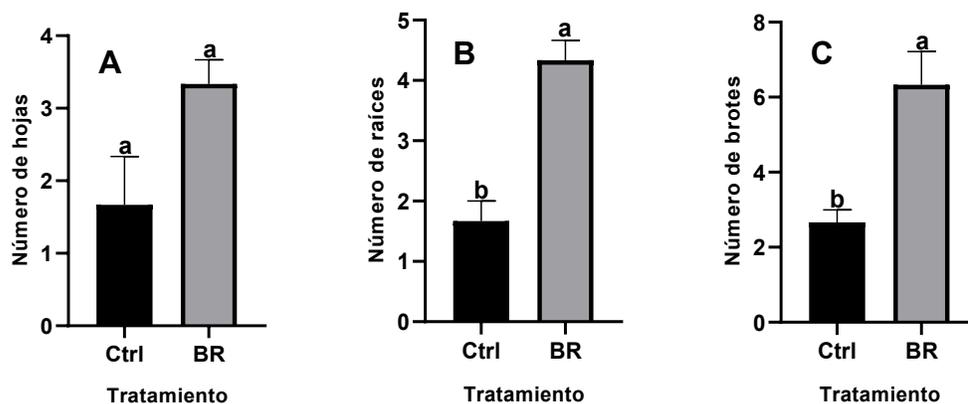


Figura 19. Número de hojas, raíces y brotes de plántulas de *V. planifolia* T4. **A)** Número de hojas. **B)** Número de raíces. **C)** Numero de brotes. Las barras representan el promedio de los datos (n=30) (p<0.05).

Los resultados mostrados en la Figura 19A, muestran el número de hojas obtenidas en el T4, cuantificando aproximadamente 3.33 ± 0.33 hojas y el control 1.66 ± 0.66 hojas, sin embargo, no muestran diferencias significativas con el control. Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016), al multiplicar *V. planifolia* sistema de inmersión temporal utilizando medio MS como medio de cultivo suplementado con $9.55 \mu\text{M}$ de BA 150 mg/L de AA y 35 mg/L de clorhidrato de cisteína y 100 mL/L de CW, obteniendo el mayor resultado en biorreactor BIG, cuantificando 2.70 ± 0.32 hojas, de la misma manera Vilcherrez Atoche (2019), al micropropagar la orquídea *Epidendrum sp.* al añadir 30 g/L de harina de plátano y 20% CW, se cuantificaron 5.98 hojas, siendo mejores los resultados obtenidos en nuestra investigación.

En los resultados obtenidos durante la fase de enraizamiento se alcanzaron 4.33 ± 0.33 raíces en el tratamiento y el control mostro 1.16 ± 0.33 raíces (Figura 19B), mientras tanto Quang y Minh *et al.* (2017) en la etapa de enraizamiento de la multiplicación en biorreactor de la planta Lirio tropical, al añadir 0.5 mg/L de ANA y CW al 10% obtuvo 3.7 raíces, obteniendo un resultado superior el de esta investigación en las plántulas de *V. planifolia*, con el sistema de inmersión temporal utilizado.

Carranza Álvarez *et al.* (2021), propago plántulas de *V. planifolia* en sistema semisólido y al añadir 30 mL/L de CW y las plántulas produjeron 4.6 ± 2.7 brotes, resultado inferior al obtenido en esta investigación con el sistema de inmersión temporal, donde se obtuvieron 6.33 ± 0.88 brotes (Figura 19C), Ruiz-Ramírez (2016), que al propagar explantes de *Cattleya rex* mediante sistema de inmersión temporal, al añadir 10 % de CW, se obtuvieron 2.95 brotes con una altura de 0.53 cm y con un promedio de 1.77 raíces, resultados inferiores en cuestión de número de brotes y altura de brotes a los de esta investigación, por otro lado, en la cantidad de raíces fueron superiores por 0.61 cm, sin embargo, el tiempo de exposición en el medio de cultivo de las plántulas de *C. rex* fue de 10 minutos cada 6 horas por 90 días y esta investigación fue de 2 minutos cada 4 horas durante 45 días, demostrando la importancia del tiempo de inmersión, donde en esta investigación fue menor y se obtuvo un resultado superior, y al ser ambas orquídeas el metabolismo es el mismo lo que indica que a menor frecuencia y tiempo de inmersión se metabolizan mejor los nutrientes del medio de cultivo.

El uso de sustratos orgánicos naturales beneficia la organogénesis, además, el aprovechamiento de los sustratos naturales promueve la morfogénesis y rizogénesis, ya que producen efectos similares a las citocininas y las auxinas debido a que contienen PGR o precursores de estas que son aprovechadas por las plántulas y además favorecen la disminución de costos en la micropropagación *in vitro* (Menezes-Gonçalves *et al.*, 2016; Velázquez-Kú *et al.*, 2016).

4.2. Cuantificación de la Capacidad Antioxidante

4.2.1. Capacidad Antioxidante del extracto de *V. planifolia* al inhibir el radical DPPH•

Uno de los principales componentes de las plantas son los antioxidantes, sustancias químicas presentes en los alimentos que protegen el organismo al prevenir las reacciones de oxidación de los radicales libres, responsables del envejecimiento y de diversas enfermedades. En esta investigación se optó por usar los ensayos de DPPH y ABTS para determinar la capacidad antioxidante. Se midió la capacidad de

los extractos para reducir los radicales catiónicos ABTS•+ y DPPH• a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg/L), dado que estos métodos son ampliamente utilizados por su simplicidad y reproducibilidad (Rivas-Pérez *et al.*, 2017), así mismo la cuantificación de polifenoles y flavonoides los cuales son los principales metabolitos responsables de la actividad antioxidante que poseen muchas plantas.

En el ensayo de inhibición del radical DPPH•, la concentración del extracto etanólico de *V. planifolia* con mejor resultado fue el de 10 mg/L, en particular, el extracto de hojas silvestres (EVPHS) obtuvo un porcentaje de inhibición de 65.74 ± 0.18 % y el extracto de plántulas de biorreactor (EVPPB) obtuvo 50.56 ± 1.13 % de inhibición del radical (Figura 20A). Asimismo, se evaluó la cantidad de mg de VCEAC/ gr extracto del mismo extracto, donde EVPHS se cuantificó 67.07 ± 1.90 mg de VCEAC/ gr extracto y el EVPPB, obtuvo 43.06 ± 1.18 mg de VCEAC/ gr de extracto (Figura 20B). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

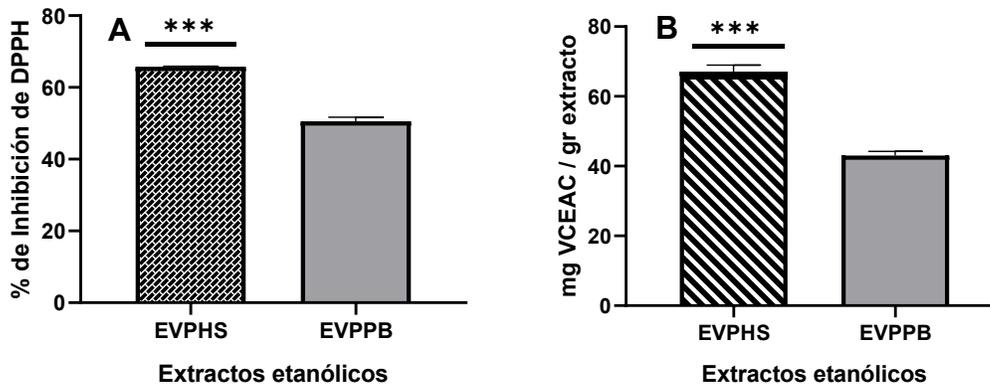


Figura 20. Porcentaje de inhibición de radical DPPH• y Concentración equivalente a ácido ascórbico en extractos de *V. planifolia*. **A)** Porcentaje de inhibición del radical DPPH• en los extractos de *V. planifolia* de hojas silvestres y de extracto de plántulas de biorreactor. **B).** Concentración equivalente al ácido ascórbico (mg/g) para DPPH• en los extractos de *V. planifolia* de hojas silvestres y de extracto de plántulas de biorreactor. Las barras representan el promedio de los datos (n=3) ($p < 0.05$).

El hecho que las plantas *in vitro* hayan obtenido menor % de inhibición antioxidante del radical se debe a que éstas se encuentran en un estado controlado, con nutrientes adecuados, luz y aislamiento, lo que hace que estas plantas no se encuentren en un estado de estrés, al contrario de las hojas silvestres que se encuentran en el medio exterior por lo que están expuestas a estrés biótico y abiótico que provoca que la producción de metabolitos secundarios aumente.

Para la inhibición de radical DPPH•, el extracto de planta silvestre mostro un porcentaje de 65.74 ± 0.18 % que es igual a 67.07 ± 1.90 de VCEAC/ gr extracto y el extracto de plantas de biorreactor 50.56 ± 1.13 % igual a 43.06 ± 1.18 mg de VCEAC/ gr de extracto (Figura 20), y una CI_{50} de 5.893 mg/mL y 9.318 mg/L respectivamente (Tabla 7), lo que concordando con Garza-Padrón *et al.* (2010), quien determino la concentración efectiva mediante la inhibición de DPPH• en callos *in vitro* y tallos silvestres de *Astrophytum myriostigma*, obteniendo una CI_{50} de 0.0553 mg/mL y 0.0270 mg/mL respectivamente, obteniendo mayor eficacia el extracto de planta silvestre. Por otro lado, Echavarria *et al.* (2016), cuantificó la capacidad antioxidante de un extracto hidroalcohólico de algunas plantas como alcachofa (*C. colymus*) con un 95.7% y un CI_{50} de 9.89 µg/mL, moringa (*M. oleífera*) 97.9% y 11.4 µg/mL y borraja (*B. officinalis*) 96.3% y 14.0 µg/mL fueron los que mostraron mayor capacidad antioxidante a una concentración del extracto de 10 µg/mL, mostrando una inhibición mayor que la de hojas de *V. planifolia*. Es importante recordar que entre menor sea la CI_{50} mayor es la eficacia del extracto ya que es la cantidad necesaria para inhibir la formación de radicales DPPH• en un 50%. Schuster *et al.* (2017), cuantificó la capacidad antioxidante del extracto etanólico de raíces *in vitro* de la orquídea *Eulophia macrobulbon*, y obtuvo un porcentaje de inhibición del radical DPPH• de 65 ± 1.0 %, porcentaje similar al obtenido de hojas de *V. planifolia* y un 10% mayor al obtenido de plántulas de biorreactor.

Tabla 7. Cl_{50} de extractos de *V. planifolia*

Tipo de extracto	Capacidad Antioxidante	Cl_{50}
Silvestre	DPPH•	5.83 mg/mL
	ABTS• ⁺	4.08 mg/mL
Plántulas Biorreactor	DPPH•	9.31 mg/mL
	ABTS• ⁺	5.67 mg/mL

En cuanto a los resultados mostrados en la Figura 20B, donde se cuantificó la concentración equivalente al ácido ascórbico (mg/g) para DPPH•, ya que la vitamina C generalmente es la responsable de la actividad antioxidante de las plantas, lo que concuerda con Jorge y Troncoso (2016), quienes cuantificaron la vitamina C (mg de ácido ascórbico en 100 g), en el fruto de tuna (*Opuntia ficus-indica*), obteniendo 36.1 ± 1.7 mg/100g y en el Ayrampo (*Opuntia apurimacensis*) con 49.9 ± 6.3 mg/100g. Asimismo, Villanueva-Tiburcio *et al.* (2010), determinaron antioxidantes en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh) y compararon la cascara fresca y seca al cuantificar el ácido ascórbico, obteniendo mejores resultados en la cascara seca donde el mayor contenido de ácido ascórbico se presenta en la cáscara del fruto pintón con 53.49 ± 9.40 mg ac. ascórbico. g^{-1} , seguido de fruto maduro 16.41 ± 3.64 mg de ac. ascórbico. g^{-1} muestra, y luego del fruto verde con 15.38 ± 5.81 mg Ac. Ascórbico. g^{-1} , además de una Cl_{50} de 46.20 ± 0.10 , 114.20 ± 0.98 y 117.80 ± 0.65 $\mu g/mL$, obteniendo resultados inferiores a los obtenidos en esta investigación donde en el extracto de *V. planifolia* de hojas silvestres obtuvo 67.07 ± 1.90 mg de VCEAC/ gr extracto.

4.2.2. Capacidad antioxidante del extracto de *V. planifolia* al inhibir el radical ABTS•⁺

En este sentido también se evaluó la capacidad antioxidante mediante la inhibición del radical ABTS•⁺ (Figura 21), en los extractos de *V. planifolia*, obteniendo el EVPHS 90.76 ± 2.31 % y el EVPPB 69.05 ± 0.95 % (Figura 21A). Asimismo, se

cuantifico la cantidad de ácido ascórbico a partir de la inhibición del radical ABTS^{•+}, resultando en 93.16 ± 1.37 mg VCEAC/gr en EVPHS y 63.11 ± 2.3 VCEAC/gr en EVPPB. Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

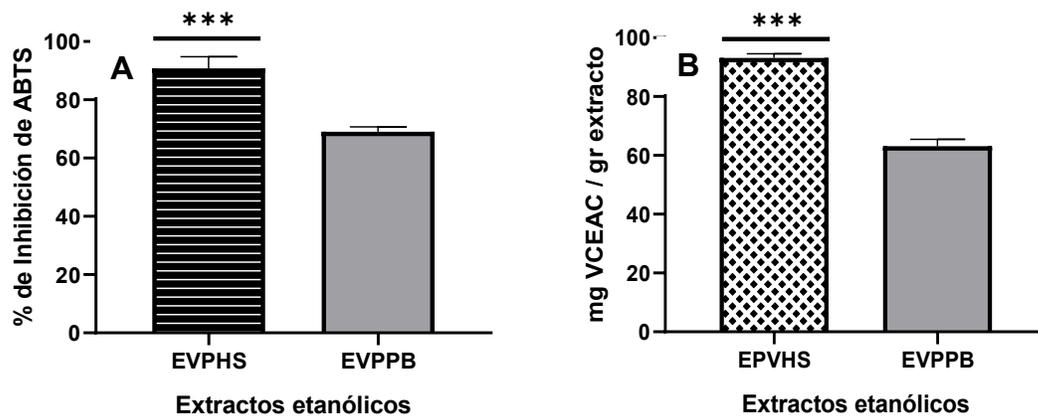


Figura 21. Porcentaje de inhibición de radical ABTS^{•+} y Concentración equivalente a ácido ascórbico en extractos de *V. planifolia*. A) Porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} en los extractos de *V. planifolia* de hojas silvestres y de extracto de plántulas de biorreactor. B). Concentración equivalente al ácido ascórbico (mg/g) para ABTS^{•+} en los extractos de *V. planifolia* de hojas silvestres y de extracto de plántulas de biorreactor. Las barras representan el promedio de los datos (n=3) ($p < 0.05$).

Según los resultados mostrados en la Figura 21A, con el porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+}, se obtuvieron mejores efectos en cuanto a la capacidad antioxidante de los extractos, autores como Fogliano *et al.* (1990); Arnao, (2000) y Antololovioch *et al.* (2002), mencionan que la técnica de ABTS^{•+} puede medir compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el radical DPPH[•], muestra compuestos disueltos en medio orgánico. Lo que sugiere que los compuestos de los extractos de hojas silvestres y de plántulas de biorreactor poseen más compuestos oxidantes que reductores. Lo que concuerda con Quino *et al.* (2016), donde la inhibición del radical ABTS^{•+} mostro mejor resultado ya que al realizar la determinación del efecto de la capacidad antioxidante de plántulas *in vitro* como *Aloe vera*, *Plukenetia volubilis*, *Caiophora carduifolia*, *Cecropia membranacea* obtuvieron una CI_{50} , donde los extractos con menor CI_{50} fueron *C. membranacea* y

C. carduifolia, resultando una inhibición del radical DPPH• con 0.159 ± 0.04 mg/L y 0.420 ± 0.06 mg/L en la inhibición del ABTS•⁺, el extracto con una CI₅₀ más baja fue *P. volubilis* con 0.154 ± 0.001 uM trolox/g extracto. Mahendran y Narmatha (2015), al propagar la orquídea *Aphyllorchis montana* y al realizar un ensayo de DPPH• a extractos metanólicos a plantas silvestres y *A. montana*, con una CI₅₀ de 26.87 µg/mL y las plántulas *in vitro* de 41.45 µg/mL.

Por otro lado, Villanueva-Tiburcio *et al.* (2010), cuantificaron el porcentaje de inhibición de la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh) a diferentes estados de madurez, y compararon la cascara fresca y seca, al determinar la inhibición del radical ABTS•⁺, obtuvieron 99.35 ± 0.46 pintón 75.23 ± 13.81 verde y maduro 67.39 ± 2.99%, además de un valor de CI₅₀ para la cáscara del fruto maduro, pintón y verde fue de 33.76, 20.25 y 32.54 µg/mL respectivamente, obteniendo una inhibición del radical similar a la de esta investigación y las plántulas de biorreactor la cascara madura. Ibarra Cantún (2017), cuantifico la capacidad antioxidante de *Vanilla planifolia* de la región de Totonacapan en un extracto metanólico y al realizar los ensayos de inhibición de radicales DPPH• y ABTS•⁺, observo una CI₅₀ en hojas de 1.07 ± 0.11 mg/mL para DPPH• y 0.69 ± 0.97 mg/mL para radical ABTS•⁺, resultados que coinciden con los obtenidos del extracto de hojas silvestres de *V. planifolia* de la huasteca potosina, al inclinarse por una mayor capacidad antioxidante, sin embargo, sus resultados muestran mayor capacidad antioxidante que la obtenida en esta investigación con 5.83 mg/mL para DPPH• y 4.08 mg/mL para ABTS•⁺, esto es debido a la diferencia de la polaridad de los solventes utilizados para cada extracto, ya que los antioxidantes tienen más afinidad al solvente metanol. Lo anterior, concuerda con Salas-Pérez *et al.* (2022), quienes evaluaron la composición química de variedades de albahaca por diferentes solventes como hexano, etanol, metanol y éter de petróleo, y obtuvieron que el metanol es el solvente que tuvo mayor eficacia de extracción en flavonoides y compuestos fenólicos, ya que la polaridad del metanol es mayor que la del etanol, por lo que los compuestos fenólicos pueden ser extraídos fácilmente (Stalikas,

2007). Un factor importante que se puede resaltar para la eliminación de radicales libres puede estar asociada a los componentes de la planta o al estrés al que sometió la misma en el lugar donde este cultivada, nutrientes del suelo, fauna y tipo de clima, lo que puede elevar significativamente la producción de compuestos bioactivos que son solubles a la polaridad del solvente utilizado.

Gonçalves *et al.* (2017), menciona la composición química de los extractos depende del método de extracción y del solvente utilizado, por lo que Primitivo *et al.* (2022), elaboró un extracto de flor de *H. italicum* con dos disolventes: agua (infusión) y acetona al 70% v/v, y al cuantificar la capacidad antioxidante equivalente a vitamina C por gramo (mg VCEAC/g), obtuvieron ABTS^{•+} 51.90 ± 4.6 mg y DPPH[•] de 39.50 ± 1.1 mg VCEAC/g para la infusión y para el extracto de acetona en ABTS^{•+} de 37.80 ± 9.8 mg y DPPH[•] 52.7 ± 9.2 mg VCEAC/g, resultados inferiores a los obtenidos al extracto de *V. planifolia*, donde se cuantifico 93.16 ± 1.37 mg VCEAC/gr en EVPHS y 63.11 ± 2.3 VCEAC/gr en EVPPB a partir de inhibición de ABTS^{•+} (Figura 21B). La cuantificación de antioxidantes en plantas importante para conocer la capacidad que tiene el extracto para inhibir radicales libres que pueden ocasionar enfermedades en los seres humanos y al consumir plantas medicinales sean una opción para erradicar estas moléculas dañinas.

4.2.3. Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extracto de *V. planifolia*

Por último, se cuantifico la cantidad de polifenoles en extracto de *V. planifolia* de hojas silvestres obteniendo 75.09 ± 3.38 mg EAG/ 100 g y en el extracto de plántulas de biorreactor donde se cuantificaron 52.76 ± 1.73 mg EAG/ 100 g. Además, se determinaron los flavonoides en los mismos extractos, obteniendo 67.36 ± 5.61 mEq CAT/ g y 33.26 ± 1.62 mEq CAT/ g, dichos resultados mostraron una diferencia significativa en la cantidad de polifenoles y flavonoides de cada extracto (Figura 22), y fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

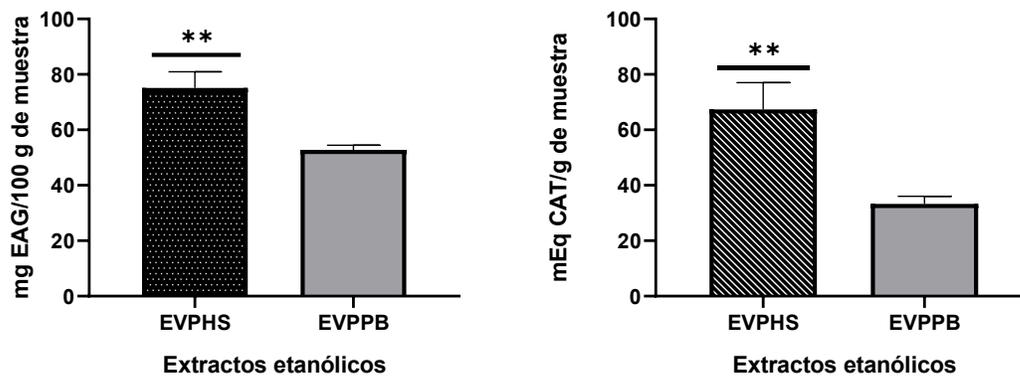


Figura 22. Concentración equivalente a ácido gálico y miligramos equivalentes a catequina en extractos de *V. planifolia*. **A)** Concentración equivalente a ácido gálico en extracto de hojas silvestres de *V. planifolia* y extracto de plántulas de biorreactor de *V. planifolia*. **B)** Concentración equivalente en mg de catequina en extracto de hojas silvestre y Extracto de plántulas de biorreactor a concentración de 10 mg de extracto/mL. Las barras representan el promedio de los datos (n=3) (p<0.05).

Además de la producción vegetal, se ha observado que la propagación de plantas *in vitro* también se puede utilizar para cuantificar la producción de compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos como los polifenoles que han atraído mucha atención en los últimos años debido a su papel en varias enfermedades degenerativas y relacionadas con el envejecimiento y actividad antiinflamatoria (Ramesh *et al.*, 1998; Brewer, 2011, Prochazkova *et al.*, 2011), lo que concuerda con Mahendran y Narmatha (2015), quienes propagaron *in vitro* la orquídea *Aphyllorchis montana*, elaborando un extracto metanólico de plántulas *in vitro*, y obtuvieron 61.98 ± 3.19 mg/g y 34.59 ± 1.14 mg/g de polifenoles totales y flavonoides, respectivamente. Además, al comparar con el extracto de planta silvestre obtuvieron 121.34 ± 1.23 mg/g y 93.17 mg/g, resultados superiores a los obtenidos en esta investigación, donde se cuantificaron 52.76 ± 1.73 mg EAG/ 100g y 33.26 ± 1.62 mEq CAT/g de muestra, resultados muy similares en los extractos de plantas *in vitro*, pero inferiores en el extracto de planta silvestres, obteniendo 75.09 ± 3.38 mg EAG/100 g y 67.36 ± 5.61 mEq CAT/g.

El contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides, alcaloides y taninos en las plantas son un grupo de compuestos que funcionan como poderosos antioxidantes, que proporcionan beneficios para la salud dado que funcionan como antiinflamatorios, anticancerígenos, y antidiabéticos (Conner y Grisham 1996). López Cruz (2024), cuantificó la cantidad de polifenoles a partir de extractos metanólicos de vainas beneficiadas del género *Vanilla*, resultado *V. planifolia* con 43.13 mg EAG/g y 51.81 mg EAG/g, *V. pompona* con 23.22 mg EAG/g y 27.65 mg/EAG/g, *V. hibrido* con 49.23 mg/EAG/g, *V. xtahitensis* con 39.82 mg/EAG/g, *V. cribbiana* 35.17 mg/EAG/g, *V. insignis* 21.82 mg/EAG/g y *V. sp* con 93.26 mg/EAG/g, comparando con el extracto de elaborado en esta investigación de *V. planifolia*, se cuantificaron mayor contenido de polifenoles totales en las hojas silvestres con 75.09 ± 3.38 mg EAG/ 100g y en el extracto de plántulas de biorreactor *in vitro* se cuantifico 52.76 ± 1.73 mg EAG/ 100g, resultados superiores a casi todas las variedades de vainas de vainilla, sin embargo *V. sp*, obtuvo un mejor resultado, obteniendo el contenido de polifenoles seguramente del proceso de beneficiado, ya que en este se llevan a cabo procesos de oxidación, reducción, polimerización, entre otras reacciones que pudieran favorecer la producción de polifenoles (Pérez Silva *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2016), además del tipo de especie, lugar de proveniencia y estrés biótico y abiótico. Por otro lado, Vásquez *et al.* (2017), elaboraron un extracto etanólico de *Gentianella dianthoides* (Kunth) Fabris, y al cuantificar los polifenoles totales, obtuvieron 10.0365 mgEAG/g de extracto, además de una CI_{50} a partir del radical DPPH• de 27.64 μ g/mL, resultados inferiores a los obtenidos a en el extracto de hojas silvestres de *V. planifolia*.

En este sentido, la cuantificación de flavonoides también es importante debido que son compuestos que se encuentran en las plantas de manera natural, aportan altos beneficios a la salud como protección inmunitaria natural y con diferentes aplicaciones biológicas como agentes anticancerígenos, antimicrobianos, antivirales, anti-angiogénicos, antipalúdicos, antioxidantes, neuroprotectores, antitumorales, y cardioprotectores (Camero *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Zhao *et*

al., 2019). Por ello, diversos autores han cuantificado la cantidad que flavonoides que hay en plantas de interés como Garcia-Ceccarelli *et al.* (2023), quienes realizaron extractos etanólicos de *Solanum radicans* L.f, y al cuantificar la cantidad de flavonoides, obtuvieron 65.89 ± 0.22 mg QAE/g y de polifenoles totales de 39.07 ± 0.63 mg GAE/g, resultados inferiores a los extractos etanólicos de *V. planifolia*, de la misma manera Es-Said *et al.* (2022), realizaron un extracto etanólico de semillas de Linaza (*Linum usitatissimum* L (Linaceae), donde al cuantificar los flavonoides obtuvieron 0.44 mg ECAT/g y fenoles totales de 6.28 mg ECAT/g, además de una Cl_{50} mediante DPPH• de 12.79 ± 0.273 mg/mL y comparado con los extractos de *V. planifolia*, ese posee mayor actividad antioxidante, lo que puede dar pie a siguientes investigaciones sobre el efecto etnofarmacológico de las hojas de *V. planifolia*.

4.3. Efecto antinociceptivo del extracto de *V. planifolia*

4.3.1. Prueba de contorsiones inducidas por ácido acético

El dolor es una sensación desagradable que es causado por estímulos intensos o dañinos, su principal función es ser de naturaleza protectora, además de ser un tipo de modalidad sensorial como sistema de advertencia de lesiones en los tejidos, a pesar de existir distintos tipos de dolor y de existir diferentes tipos de causas todos se relacionan con malestar físico que afecta tener una vida tranquila y se puede volver crónico y debilitante (Julius y Basbaum, 2001; Hucho y Levine, 2007).

El tratamiento de dolor con los fármacos que existen en el mercado actualmente como antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y opiáceos, no son eficaces en todos los casos debido a que su actividad se ha visto opacada por efectos adversos, o su uso prolongado en el caso de los AINES deteriora órganos vitales como los riñones (Zendejdel *et al.*, 2011). Por lo que el uso de plantas medicinales podría ser una fuente importante de nuevas sustancias terapéuticas.

La prueba de contorsiones inducida por ácido acético es una prueba de dolor tipo visceral, pero no es para dolor específico, en este ensayo se estimulan las neuronas

nociceptivas periféricas mediante mediadores endógenos como la bradicinina, serotonina y capsaicina que generan dolor y aumentan las prostaglandinas PGE2 y la PGF2a, también estimula la liberación de ácido araquidónico libre del fosfolípido tisular, mediado por mastocitos peritoneales (Bentley *et al.*, 1983; Hosoi, 1999; Ribeiro *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2006; Lujan-Carpio *et al.*, 2018).

En esta sección se evaluó el efecto antinociceptivo del extracto etanólico de hojas silvestres de *V. planifolia*, mediante el conteo de contracciones inducidas por ácido acético, utilizando concentraciones del extracto de 10, 100 y 200 mg/kg, obteniendo una media de contracciones de 29.75 ± 2.76 , 23.00 ± 5.48 y 11.43 ± 2.72 respectivamente, comparándolo con el vehículo el cual registro una media de 48.25 ± 2.54 contracciones y el control positivo que el cual fue naproxeno 100 mg/kg y registró 22.00 ± 1.93 contracciones (Figura 23). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

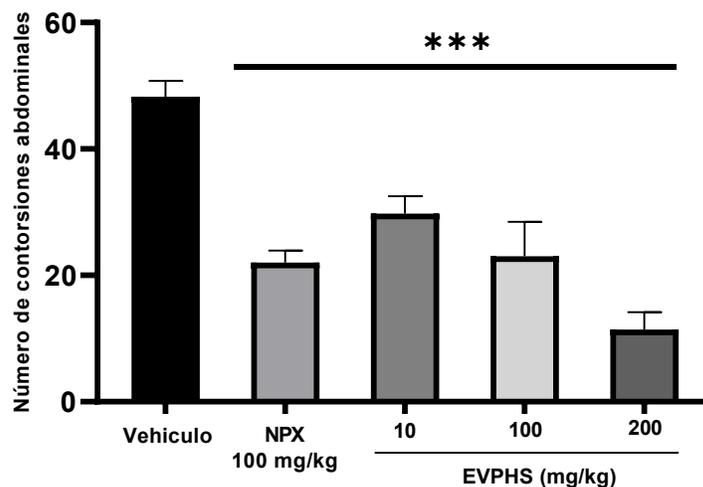


Figura 23. Efecto antinociceptivo del extracto de *V. planifolia* de hojas silvestres en la prueba contracciones inducidas por ácido acético a dosis de 10, 100, 200 mg/kg. NPX (100 mg/kg) fue el control positivo, mientras que el vehículo fue solución salina. Los resultados experimentales se compararon con los valores del vehículo, expresado como media \pm SEM ($n=8$). Se determinó una diferencia significativa (***) a $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que el extracto de hojas de *V. planifolia* disminuyó las contorsiones en los ratones en comparación con el grupo control, lo que indica que el extracto posee actividad antinociceptiva con una DE₅₀ de 72.62 mg/kg (Figura 24). El género Orchidaceae es un grupo de plantas de gran interés debido a sus extensas propiedades medicinales, por lo que este equipo de trabajo ha optado por investigarlas. Las orquídeas que han sido estudiadas son: *Catasetum integerrimum*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Laelia anceps subsp. anceps* y *Stanhopea tigrina* (Maldonado-Miranda *et al.*, 2023).

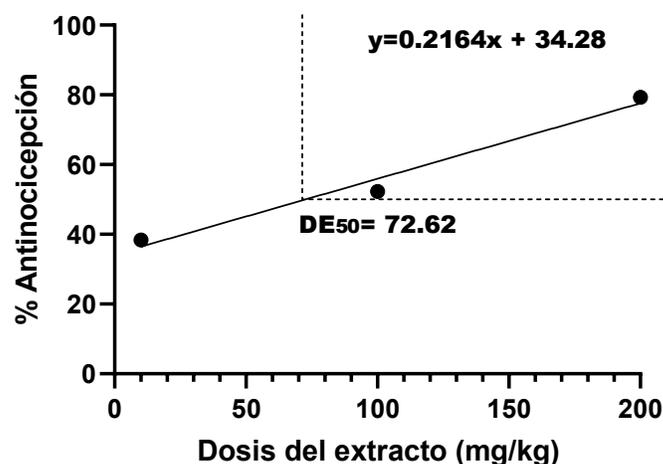


Figura 24. Curva dosis-respuesta DE₅₀ para el efecto antinociceptivo prueba de ácido acético del extracto de *V. planifolia*.

Ponce-Hernández (2018), elaboró un extracto etanólico de pseudobulbos y raíces de *Cyrtopodium macrobulbon* a 100 mg/kg, mediante el ensayo de contorsiones inducidas por ácido acético, observó la actividad antinociceptiva de los extractos, encontrando que los pseudobulbos no poseen actividad contra el dolor. Sin embargo, el extracto de raíz mostró resultados favorables con 24.5 contorsiones en comparación con el control, que tuvo 52.6 contorsiones obteniendo una DE₅₀ de 7.08 mg/kg, sin embargo, en esta investigación a la misma dosis se obtuvieron 23.00 ± 5.48 contorsiones, con una DE₅₀ de 72.62 mg/kg (Figura 24). De manera similar, Chowdhury *et al.* (2014) realizaron extractos metanólicos y acuosos de

hojas de la orquídea *Vanda tessellata* Roxb. a concentraciones de 200 y 400 mg/kg, encontrando que el extracto metanólico mostró la mayor actividad antinociceptiva con 32.84 contorsiones y un 45.08 % de inhibición en comparación con el control, que tuvo 59.80 contorsiones. Asimismo, Caudillo-Gaona *et al.* (2023), realizaron un extracto etanólico de *Catasetum integerrimum* Hook. a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/kg, registrando que la concentración de 100 mg/kg obtuvo mejores resultados que el control, disminuyendo significativamente las contorsiones y estando ligeramente por debajo del control positivo (Naproxeno 100 mg/kg).

Padgaonkar *et al.* (2018) elaboraron extractos etanólicos y acuosos de hojas de la orquídea *Bauhinia acuminata* Linn., observando actividad antinociceptiva a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/kg. El extracto acuoso a 1000 mg/kg mostró el mejor porcentaje de inhibición con un 74.54 % y 27.50 ± 1.18 contorsiones en comparación con el control que obtuvo 48.00 ± 1.53 contorsiones. En contraste, la concentración con menor actividad antinociceptiva fue de 250 mg/kg en el extracto etanólico, con 40.33 ± 1.78 contorsiones. Esta dosis es similar a la utilizada en nuestra investigación, donde se registraron 11.43 ± 2.72 contorsiones, indicando un mayor efecto terapéutico a la dosis similar.

El método de contorsiones de ácido acético es confiable ya que permite evaluar de manera rápida la acción periférica de acción analgésica, ya que mediante la administración del ácido acético el dolor es provocado por el suministro de un irritante (ácido acético) en la cavidad peritoneal que produce las contorsiones y los estiramientos del modelo murino provocadas por el dolor, lo que permite observar la actividad analgésica (Duarte *et al.*, 1988; Melo *et al.*, 2008).

4.3.2. Prueba de formalina

Para evaluar el efecto antinociceptivo mediante la prueba de formalina, se registró el tiempo que tardaba en lamer la pata trasera cada ratón, dividiendo la prueba en fase 1 (0 a 15 min), registrándose los siguientes datos: el vehículo con una media de 77.17 ± 5.19 segundos, el control positivo (Tramadol 30 mg/kg) $22.50 \pm$

1.83 segundos, el extracto de *V. planifolia* de EVPHS a 10 mg/kg con 75.50 ± 24.04 segundos, 100 mg/kg con 67.80 ± 14.41 segundos y 200 mg/kg con 61.33 ± 12.10 segundos. En la fase 2 (de 15 a 45 minutos), donde el vehículo registro 225 ± 12.45 segundos, el control positivo 43.50 ± 3.51 segundos, EVPHS a 10 mg/kg 118.60 ± 15.45 segundos, 100 mg/kg 75.67 ± 16.34 segundos y 200 mg/kg 62.83 ± 9.86 segundos (Figura 25). Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

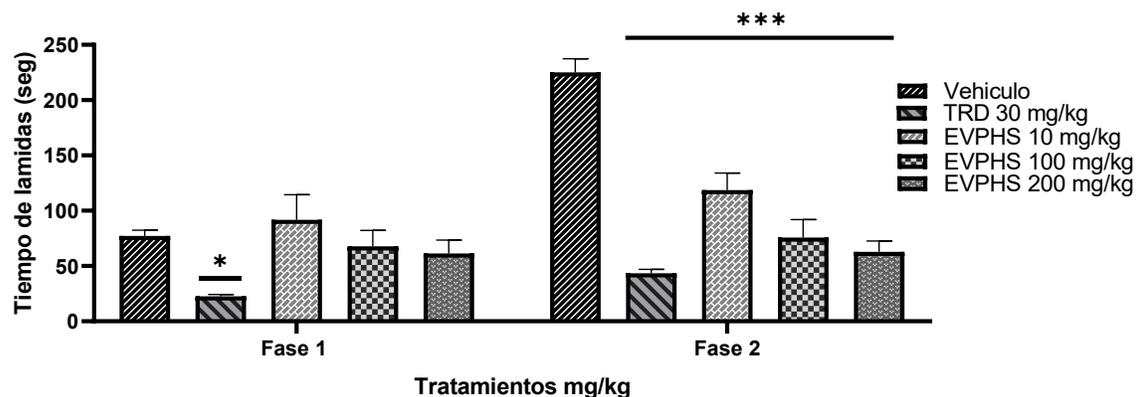


Figura 25. Efecto antinociceptivo de extracto de *V. planifolia* de hojas silvestres en la prueba de formalina a dosis de 10, 100, 200 mg/kg donde se muestran en las dos fases de la prueba de formalina. TRD (30 mg/kg) fue el control negativo, mientras que el vehículo fue solución salina. La figura muestra las dos fases de la prueba de formalina. Los resultados experimentales se compararon con los valores del vehículo expresado como la media \pm SEM ($n=6$). Se determinó una diferencia significativa (***) a $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo.

La prueba de formalina es un procedimiento que evalúa el dolor central y periférico a través de dos fases: la primera fase indica el dolor neurogénico, provocado por la inyección de formalina, mientras que la segunda fase es inflamatoria, influenciada por cininas, leucocitos y células que pueden favorecer factores endógenos (Shailly *et al.*, 2010 y Arif *et al.*, 2014). En los resultados de esta prueba *in vivo*, se observó que durante la fase 1, las concentraciones del extracto de *V. planifolia* no mostraron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, en la fase 2, todas las concentraciones suministradas mostraron diferencias significativas, siendo la más

efectiva la de 200 mg/kg (Figura 25), con una DE₅₀ de 11.06 mg/kg (Figura 26) resultando la dosis a la que la mitad de los ratones tienen un efecto antinociceptivo, Yáñez-Barrientos *et al.* (2022), realizaron extractos etanolicos de raíces de las orquídeas *Laelia anceps* y *Cyrtopodoum macrobulbon*, los cuales indujeron actividad antinociceptiva en la segunda fase de la prueba de formalina con una DE₅₀ de 97 mg/kg y 29 mg/kg respectivamente, siendo menor la DE₅₀ obtenida en el extracto de hojas silvestres de *V. planifolia*.

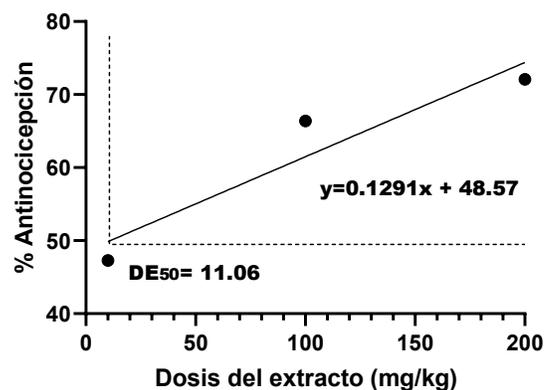


Figura 26. Curva dosis-respuesta DE₅₀ para el efecto antinociceptivo prueba de formalina del extracto de *V. planifolia*.

Uno de los estudios que ha investigado extractos de segmentos vegetales de orquídeas, como las hojas, es el de Begum *et al.* (2018), en el cual, se elaboró un extracto metanólico de hojas y raíces de la orquídea *Vanda roxburghii* (Roxb) a concentraciones de 50 y 100 mg/kg. Los resultados mostraron que el extracto de hojas a 100 mg/kg tuvo un mayor efecto antinociceptivo en la fase 1, con 12.75 ± 2.49 segundos en comparación con el control de 26.25 ± 1.37 segundos, y en la fase 2, con 1.5 ± 0.86 segundos respecto al control de 13.5 ± 1.19 segundos. Estos resultados demuestran el efecto de dicha orquídea contra el dolor periférico e inflamatorio. Hossain *et al.* (2020), elaboraron un extracto metanólico de secciones vegetales de las orquídeas, *Luisia zeylanica* Lindl. y *Papilionanthe teres* (Roxb.) Schltr. a dosis de 200 y 400 mg/kg, donde ambos casos a la dosis de 400 mg/kg

con 20.0 ± 0.82 y 22.67 ± 0.47 segundos para la fase 1 y 18.0 ± 0.82 y 18.0 ± 1.63 para la fase 2 respectivamente, utilizando como control solución salina con 68.16 ± 1.30 y 52.50 ± 0.92 para fase 1, por lo que esta investigación los mejores resultados se obtuvieron a una dosis de 200 mg/kg con 62.83 ± 9.86 segundos.

En las dos fases del modelo de formalina se pueden detectar dos tipos de dolor, ya que la inyección en la pata trasera induce una respuesta al dolor bifásica, donde en la fase aguda (fase 1) se activan las neuronas aferentes primarias, debido a la estimulación química excitando las neuronas sensoriales que activan a TRAPPA1, un canal catiónico importante en el dolor inflamatorio, y la activación de la fibra c, mientras que la fase tardía (fase 2) depende de la combinación del dolor inflamatorio de los efectos combinados de la entrada aferente de la sensibilización central en el asta dorsal de la medula espinal, la cual es iniciada por el bombardeo de fibras C (Tjolsen *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 2002; McNarama *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2020).

Así mismo Padgaonkar *et al.* (2018), quien realizó extractos etanólicos y acuosos de *Bauhinia acuminata* Linn. a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/kg, resultó el extracto acuoso el que me mayor efecto atinocectivo registro con 26.67 ± 1.12 segundos en la fase 1 y 26.67 ± 1.50 segundos en la fase 2, comparado con el control con 96.17 ± 0.83 y 75.67 ± 0.99 segundos respectivamente. Sin embargo, la concentración utilizada es 5 veces mayor a la utilizada en esta investigación, comparando la menor concentración de 250 mg/kg obtuvieron 62.17 ± 0.79 y 51.83 ± 1.08 en fase 1 y fase 2 en el extracto acuoso, el extracto etanólico de hojas de *V. planifolia* tiene un mayor efecto antinocectivo en la fase 2 del experimento reduciendo significativamente el tiempo de lamidas. Por lo anterior se considera que entre más altas las dosis suministradas de los extractos es mayor efectividad terapéutica. En este sentido se puede decir que el extracto de hojas silvestres de *V. planifolia* solo mostró efecto antinoceptivo en la fase tardía del experimento, por lo que solo participa en el dolor provocado por la inflamación.

V. CONCLUSIONES

1. Se estableció el sistema de biorreactores de inmersión temporal InvitroOrchid® en plántulas de *V. planifolia* provenientes de un sistema semisólido. Este sistema demostró ser eficaz para la producción de biomasa y vitroplantas a gran escala y en menor tiempo. Gracias a sus cualidades biotecnológicas, el sistema de inmersión temporal es una opción viable para la propagación de *V. planifolia*, utilizando una frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 4 horas. Además, se probó una combinación de hormonas vegetales para incrementar la eficacia de la reproducción de las plántulas, demostrando que el mejor tratamiento fue el Tratamiento 1 (T1), que contenía 3 ppm de BAP, 1.5 ppm de AIA y 150 mg/L de ácido ascórbico. Este tratamiento favoreció la altura de las plántulas y brotes, así como el número de hojas, raíces y brotes.

2. Los ensayos realizados para cuantificar la capacidad antioxidante demostraron que los extractos etanólicos a una concentración de 10 mg/L de plántulas de *V. planifolia* provenientes de un sistema de biorreactor temporal (EVPPB) y de hojas silvestres de *V. planifolia* (EVPHS) poseen actividad antioxidante, ya que inhibieron considerablemente los radicales DPPH• y ABTS•+. Además, se calculó la CI_{50} mediante la inhibición del radical ABTS•+, lo que indica la eficacia del extracto, y se cuantificaron los mg equivalentes de ácido gálico y meq. de catequina necesarios para la inhibición de los radicales. También se cuantificó la cantidad de polifenoles y flavonoides en los extractos, revelando que las plántulas provenientes del sistema de biorreactores poseen actividad antioxidante, aunque el extracto de hojas silvestres obtuvo mejores resultados.

3. Por último, se demostró que el extracto de hojas silvestres de *V. planifolia* presenta un efecto antinociceptivo mediante la prueba de contorsiones inducidas por ácido acético mostrando un efecto dependiente de la dosis con una DE_{50} de 72.62 mg/k. La dosis de 200 mg/kg resultó en un menor número de contorsiones, demostrando el efecto analgésico del extracto. Asimismo, en la prueba de formalina, se obtuvo una respuesta significativa en la fase 2, con una DE_{50} de 11.06 mg/kg indicando que el extracto tiene un efecto sobre el dolor provocado por la inflamación.

VI. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación son el primer indicio del establecimiento de sistema de biorreactores de inmersión temporal en el Laboratorio de Ciencias Ambientales FEPZH, se sugiere seguir realizando combinaciones de hormonas vegetales, además de prolongar el tiempo al que se sometió el experimento para una mayor obtención de biomasa. Asimismo, sugiere hacer pruebas de aclimatación de las vitroplantas de *V. planifolia* debido a las ventajas que ofrece el sistema de biorreactores en la aeración, nutrición y la maduración estomas, a diferencia del sistema semisólido.

Se sugiere establecer experimentos *in vitro* donde se expongan las plántulas de *V. planifolia* a diferentes tipos de estrés, con la finalidad de la obtención de metabolitos secundarios que puedan ser de utilidad para futuras investigaciones etnofarmacológicas de la planta en modelos murinos.

Por último, sería de gran interés realizar otras pruebas de antinocicepción en extractos de *V. planifolia* para complementar la presente investigación, así como elucidar el mecanismo de acción antinociceptivo de *V. planifolia*, y seguir investigando las propiedades etnofarmacológicas de los segmentos vegetales de *V. planifolia*.

VII. REFERENCIAS

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y. and Dobránszki, J. (2022). An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae*, 8(8), 677.
- Abraham, D.J., Mehanna, A.S., Wireko, F.C., Whitney, J., Thomas, R.P., Orringer, E.P. (1991). Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood*;77(6):1334-41.
- Ahmed, A. A., Rahman, M. A., Hossen, M. A., Reza, A. A., Islam, M. S., Rashid, M. M., y Uddin, M. N. (2021). Epiphytic *Acampe ochracea* orchid relieves paracetamol-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and upregulating antioxidant genes *in vivo* and virtual screening. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112215.
- Ahmed, F., Hossain, M. H., Rahman, A. A., Shahid, I.Z. (2006). Efectos antinociceptivos y sedantes de la corteza de *Cerbera odollam* Gaertn. *Orient Pharm Exp Med*. 6:344–8.
- Allkin B. (2017). Useful Plants – Medicines: At Least 28,187 Plant Species are Currently Recorded as Being of Medicinal Use. In: Willis KJ, editor. State of the World's Plants 2017. London (UK): *Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Amalnath, A., Gowri, V., Punnagai, K. y Harshitha, S. (2020). Actividad antiproliferativa del extracto de tallo de vainilla en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7. *La invención de la droga hoy*, 13 (6).
- ANTOLOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, 127, 183-198.
- Arditti, J. (2008). Micropropagation of Orchids, Blackwell Publishing, Hoboken, NJ, USA, *Annals of Botany*, 12, 104-110.
- Arevich, M. B., & Pérez, J. L. P. (2021). Multiplicación de brotes de morera variedad Doña Betty en Sistema de Inmersión Temporal (Original). *Redel. Revista Granmense de Desarrollo Local*, 5(1), 64-73.

- Argueta, A., Cano, A., Rodarate, M.E., 1994. Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, Mexico, DF, 1786.
- Arif, U.H.M., Sayera, Z., Fatematuj, J., Lucky, A., Syed, M.T., Emranul, H., Masum, R.B.(2014). Evaluation of antinociceptive, *in-vivo* & *in-vitro* antiinflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. *BMC Complement Altern Med*; 14:346
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 419-421, 2000.
- Arora, M., Arora, K., & Kaur, R. (2023). Pharmacognostic, physicochemical, phytochemical, nutraceutical evaluation and *in vitro* antioxidant potency of *Habenaria intermedia* (D. Don) Szlach-A rare orchid. *South African Journal of Botany*, 152, 278-287.
- Barragán-Zarate, G. S., Alexander-Aguilera, A., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., & Soto-Rodríguez, I. (2021). Bioactive compounds from *Prosthechea karwinskii* decrease obesity, insulin resistance, pro-inflammatory status, and cardiovascular risk in Wistar rats with metabolic syndrome. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114376.
- Barroso J, Branco P, Apkarian AV. (2021). Brain mechanisms of chronic pain: critical role of translational approach. *Transl Res.*;238:76-89.
- Beaudry F., Ross A., Lema P.P., Vachon P. (2010). Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res.*;24(4):525-30.
- Begum, Y., Sen, P., Bulbul, I., Nasrin, F. (2018) *Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Potentials of the Leaf and Root Extracts of *Vanda roxburghii* (Roxb)*. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 5 (2). pp. 1-8.

- Bellone, R. (2006). Orquídea. Guías del aficionado. Ediciones Ortega. Barcelona, España.
- Bentley GA, Newton SH, Starr J (1983). Studies on the anti-nociceptive action of agonist drugs and their interaction with opioid mechanisms. *Br J Pharmacol.* 79: 125-134.
- Bermúdez Avendaño, J. L., y Treviño Treviño, F. E. (2014). Estudio de la cadena de suministro de la producción de vainilla en México. *Vinculatégica*, (1), 178-197.
- Bhatia, S., y Dahiya, R. (2015). Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 12, 121–156.
- Bolaños, J. B. A., Rivera-Coto, G., Vásquez, A. P., Solórzano, R. C., & Salas, E. (2019). Desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 33-49.
- Bory, S., Lubinsky, P., Risterucci, A. M., Noyer, J. L., Gisoni, M., Duval, M. F., y Besse, P. (2008). Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany*, 95, 805-815.
- Brenes, A. A., Castillo, M. R., y Gómez, A. L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium spp.*) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39, 7-23.
- Brewer, M.S., 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanism of action, and potential application. *Comp. Rev. Food Sci.* 10, 221–247.
- Bye Jr., R., (1993). The role of humans in the diversification of plants in Mexico. In: Ramamorthy, T.P., Bye, R., Lot A., Fa, J. (Eds.). Biological diversity of Mexico. Origins and distribution. Oxford University Press, London pp 707.

- Bye, R., Linares, E. (2015). Perspectives of ethnopharmacology in Mexico. Heinrich M, Jäger AK. *Ethnopharmacology*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, p. 393–404.
- Cajina Silva, A. J. (2023). *Micropropagación de Teca (Tectona grandis Linn F.) en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal, 2021-2022* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
- Calvache Román, C. A., & Freire Alarcón, J. B. (2019). *Diseño y desarrollo de un sistema de inmersión temporal semi-automatizado destinado a la micropropagación masal de especies vegetales* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas).
- Camero, C.M.; Germanò, M.P.; Rapisarda, A.; D'Angelo, V.; Amira, S.; Benchikh, F.; Braca, A.; De Leo, M.(2018). Anti-angiogenic activity of iridoids from *Galium tunetanum*. *Rev. Bras. de Farmacogn.* , 28, 374–377.
- Campos A. R., Albuquerque F. A. A., Rao V. S. N., Maciel M. A. M., Pinto A. C. (2002). *Fitoterapia*, 73, 116—120.
- Capriotti, T. M., & Frizzell, J. P. (2015). *Pathophysiology: Introductory concepts and clinical perspectives*. FA Davis Company.
- Carr D, Goudas LC. Acute pain. *Lancet*. 1999; 353:2051–8. 2.
- Carranza Álvarez, C., Morales López, A. y Maldonado Miranda, J.J. (2020). Producción *in vitro* de *Vanilla planifolia*. Facultad de estudios profesionales zona huasteca, UASLP. *Universitarios Potosinos* 16-21.
- Carranza Álvarez, C., Trinidad-García, K. L., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez, L. J., & Fortanelli-Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia*, 23(1), 5–12.
- Carranza-Álvarez. C., Hernández-Benavidez, D., Maldonado-Miranda. J. (2016) Micropropagación de orquídeas del humedal natural Ciénega de Cabezas, Tamasopo. *Universitarios Potosinos*, 13, 4-10.

- Castillo-Pérez, L. J. (2018). Aclimatación simbiótica de vitroplantas de *Encyclia parviflora* (Regel) withner y *Stanhopea tigna* bateman (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*.
- Castro, M. A. R. (2022). EL USO DE MEDICINA TRADICIONAL EN CONJUNTO CON TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2.
- Castro, M. D. R., Hernández, J. A., Marcilla, S., Córdova, J., Solari, A., & Chire, G. (2016). Efecto del contenido de grasa en la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de *Theobroma cacao* L." cacao".
- Caudillo-Gaona, M. Y., Caudillo-Gámez, K. L., Caudillo-Gámez, K. L., Vargas-Roa, M. A., Torres-Rico, D., Carranza-Alvarez, C., Alonso-Castro, Ángel J. (2023). Evaluación *in vivo* del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae). *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 21, 1–7. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/articloe/view/4037>
- Chami, B., Martin, N. J., Dennis, J. M., & Witting, P. K. (2018). Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. *Archives of biochemistry and biophysics*, 645, 61-71.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon A.M., Salazar, G, van den Berg C, Schuiteman A. (2015). Una clasificación actualizada de Orchidaceae. *Bot J Linn Soc*; 177: 151- 174.
- Chen, O., Donnelly, C.R., Ji, R.-R.J.C.o.i.n. (2020). Regulación del dolor por interacciones neuroinmunes entre macrófagos y neuronas sensoriales nociceptoras.
- Chowdhury, M. A., Rahman, M. M., Chowdhury, M. R. H., Uddin, M. J., Sayeed, M. A., & Hossain, M. A. (2014). Antinociceptive and cytotoxic

activities of an epiphytic medicinal orchid: *Vanda tessellata* Roxb. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 1-7.

- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2006). Red Mundial de Información sobre Biodiversidad. <<http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remibnodosdb.html>>. Fecha de consulta: 24 de agosto de 2024
- Conner EM, Grisham MB. 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12(4): 274 –277.
- Contreras-Loera, F., Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., y Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). Micropropagación del alcaparro en medio semisólido y en biorreactores de inmersión temporal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(1), 37-48.
- Cortes, T. R., Perea-Estrada, H., Pérez, P. A. L., Jiménez, G. D. C. R., Robles-Olvera, V. J., Aparicio-Burgos, J., & Parra, J. A. C. (2019). Actividad antifúngica del jugo de vainilla y la vainillina contra *Alternaria alternata*. *CyTA: Journal of food*, 17(1), 375-383.
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6), 80-84.
- Cruz Villegas, I. (2018). *Innovación en la micropropagación comercial de banano (Musa AAA cv. Gran Enano) utilizando un sistema de inmersión temporal* (Master's thesis).
- Cruz, N. D. S. M., Villanueva, J. L. M., Ronzón, Y. C., Sánchez, R. A. G., & Analco, J. A. G. (2020). Perfil de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de *Rhynchosstele rossii* (Orchidaceae) silvestre y cultivada *in vitro*. *Acta Botanica Mexicana*, (127).
- Cruz-García, G, Lagunes-Rivera, L., Chávez-Ángeles, M., G, Solano-Gómez, R. (2015). The wild orchid trade in a Mexican local market: diversity and economics. *Economic Botany* 20: 1-15.

- Damon, A. A. (2019). *¡ Orquídeas en peligro!: guía de manejo sustentable en el Socunusco*. El Colegio de la Frontera Sur.
- De Lourdes Tapia, M., & Pando, L. R. G. (2022). Propagación clonal de líneas avanzadas de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) en un sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal. *Peruvian Journal of Agronomy*, 6(3), 256-262.
- Déciga-Campos, M., Palacios-Espinosa, J. F., Reyes-Ramírez, A. y Mata, R. (2007). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 161– 168.
- Del Arco, J. (2015). Fisiopatología, clasificación y tratamiento farmacológico. *Farmacia profesional, curso básico sobre el dolor*, 29: (1), 36-43.
- Delgado, F. L., & Luque, A. B. (2023). Micropropagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal (BIT). *Biosaia: Revista de los másteres de Biotecnología Sanitaria y Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria*, (12).
- Deng Y, Johnson DR, Guan X, Ang CY, Ai J, Perkins EJ (2010). *In vitro* gene regulatory networks predict *in vivo* function of liver. *BMC Syst Biol* 4:153.
- Diez-Gómez, M.C. (2014). Ecofisiología de la vainilla *Vanilla planifolia* Andrews. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Medellín, Colombia.
- Divakaran M, Babu KN, Peter KV. (2009). Protocols for Biotechnological Interventions in Improvement of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews.). *Methods Mol Biol*. 1391, 47-63.
- Divakaran, M., Babu, KN., Peter, KV. (2016). Protocolos para intervenciones biotecnológicas en la mejora de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews.). *Métodos Mol Biol*, 1391, 47-63.
- Dressler, R. L. (2005). How many Orchid species? *Selbyana*, 26, 155-158.

- Duarte I. D. G., Nakamura M., Ferreira S. H., Braz. J. (1988). *Med. Biol. Res.*, 21, 341—343.
- Durant, S. y Karran, P. (2003). Vanillinas: una nueva familia de inhibidores de DNA-PK. *Investigación de ácidos nucleicos*, 31 (19), 5501–5512.
- Echavarría, A. M., Regnault, H. D. A., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., de Astudillo, L. R., y Benitez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales/Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Revista Ciencia UNEMI*, 9(20), 29-35.
- Ellison, D. L. (2017). Physiology of Pain. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(4), 397–406.
- Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L. M., y Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica*, 42, 197-214.
- Espinoza Pérez, J. (2016). *Estudio de factores socio-culturales que influyen en el manejo de la vainilla (Vanilla planifolia Jacks ex Andrews), en la región Totonacapan, México* (Master's thesis).
- Es-Said, S., Lafhal, K., Elkhayat, A., Hammoud, M., Regbaoui, N., Ezoubeiri, A. y Fdil, N. (2022). Flaxseed extract reduces tissue accumulation and enhances urinary excretion of chondroitin sulphate in the rat: a possible new path in substrate reduction therapy for mucopolysaccharidosis. *Pharmaceutical Biology*, 60(1), 879-888.
- Ferrara, L. (2020). Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*. *International Journal of Medical Reviews*, 7(1), 25-29.
- Fillingim RB. (2017). Individual differences in pain: understanding the mosaic that makes pain personal. *Pain*. 158.

- Flores-Palacios, A., y S. Valencia-Díaz. (2007). "Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes". *Biological Conservation*, 136: 372-387.
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1035-1040.
- Fowler, M.R., F.W. Rayns and C.F. Hunter (1993). The language and aims of plant cell and tissue culture. *In vitro Cultivation of Plant Cells, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford*, Page 1-18.
- Gallage, N. J. y Møller, B. L. (2015). Vanillin–bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Mol. Plant*, 8, 40–57.
- Gamboa-Gaitan, M. A. (2014). Vainillas colombianas y su microbiota; Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos. *Universitas Scientiarum*, 287-300.
- Gamborg O y Shyluk J. (1981). Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Thorpe T (Ed): *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York*, p21-44.
- García, M. B., Araluce, C. R., Rubio, Y. C., Rodríguez, S. M., & Feria, R. V. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología vegetal*, 4(4).
- Garcia-Ceccarelli, J., Surco-Laos, F., Bendezu-Acevedo, M., Palomino-Jhong, J., Laos-Anchante, D., Loyola-Gonzales, E., ... & Alvarado, A. T. (2023). Flavonoides totales, metales bioactivadores y actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de *Solanum radicans* Lf. *Revista Cubana de Farmacia*, 55(4).
- Garza-Padrón, R. A., Verde-Star, M. J., Morales-Rubio, M. E., Oranday-Cárdenas, A., Rivas-Morales, C., Núñez-González, M. A., & Barrón-González, M. P. (2010). Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico

de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Polibotánica*, (30), 111-121.

- Gavendeel, A. Smithson, F.J.W. Slik, (2004). Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 359, 1523-1535.
- Gebauer G., Preiss K., Gebauer A., C. (2016) Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist* 211: 11–15.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & T. Bley. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*. 14(6), 607-621.
- Gil-Rodríguez, J. R., Herrera-Rojas, M. F., Mitre-Velasco, Y., & Santamaria-Rivas, C. (2020). Compuestos activos en plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *RD-ICUAP*, 6(1), 175-200.
- Gonçalves, J., Silva, C. L., Castilho, P, C., and Câmara, J. S. (2013). “An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines,” *Microchem. J.*, vol. 106, pp. 129–138.
- Gonçalves, S., Moreira, E., Grosso, C. *et al.* (2017). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *J Food Sci Technol* 54, 219–227.
- González-Arias, M., Panta, J. B., Yáñez, P. B., Contreras-Díaz, H., Jara, E. M., & Reyes, B. M. (2023). Afectividad, síntomas somáticos y dolor psicológico como dimensiones del bienestar: un modelo de senderos en estudiantes universitarios chilenos. *Revista de Psicología*, 41(2), 787-821.
- González-Arno, M. T., Lázaro-Vallejo, C. E., Engelmann, F., Gámez-Pastrana, R., Martínez- Ocampo, Y. M., Pastelin-Solano, M. C., y Díaz-

- Ramos, C. (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* "Andrews"). *In vitro Cellular y Developmental Biology - Plant*, 45, 574–582.
- Grassi, D; Desideri, G; Croce, G; Tiberti, S; Aggio, A; Ferri C. (2009). Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des.*15: 1072-1082.
 - Groh IA, Chen C, Lüske C, Cartus AT, Esselen M. (2013). Los polifenoles vegetales y los metabolitos oxidativos del metileugenol alquenilbenceno herbal suprimen la actividad de la histona desacetilasa en las células de carcinoma de colon humano. *J Nutr Metab.* 821082.
 - Grotewold, E. (2006). La genética y bioquímica de los pigmentos florales. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 761-780.
 - Gutiérrez Novoa, Y. (2021). Orquídeas Las Orquídeas y su acción parasitaria, un nuevo cambio en su apreciación tradicional: Las Orquídeas y su acción parasitaria, un nuevo cambio en su apreciación tradicional:. *Encuentro SENNOVA Del Oriente Antioqueño*, 6(1).
 - Gutiérrez, R. M. P., & Carlos, H. V. (2011). Anti-diabetic activity of an hexane extract of *Prosthechea michuacana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 10(6), 570-580.
 - Gutiérrez, R. M. P., & Solis, R. V. (2009). Relaxant and antispasmodic effects of extracts of the orchid *Encyclia michuacana* on isolated guinea pig ileum. *Journal of natural medicines*, 63, 65-68.
 - Gutiérrez, R. M. P., Gomez, Y. G. Y., & Ramirez, E. B. (2010). Nephroprotective activity of *Prosthechea michuacana* against cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Journal of Medicinal Food*, 13(4), 911-916.
 - Gutteridge JM. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* 91(2-3):133-40

- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A., y Dressler, R. L. (2015). *Las orquídeas de México. Instituto Chinoín México, D.F. 2ª Edición*, 304 pp.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M Plata-Oviedo, M. S. V and. Peralta, R. M. (2012) “Phenolic compounds in fruits - an overview,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, 10, pp. 2023–2044..
- Hernández Guiance, S. N., Marino, L., Isern, D. M., Coria, I. D., & Irurzun, I. M. (2019). Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales. *Invenio*, 22.
- Hernández, F., 1959. Historia Natural de Nueva España. Tomo II y VII. UNAM, México.
- Hernández-Hernández, J., (2011). Vanilla Diseases, in Handbook of vanilla science and technology. D. Havkin-Frenkel and F.C. Belanger.
- Hilario Sinche, K. T. (2020). Extracción de compuestos fenólicos del Hercampuri (*Gentianella nítida*) asistido por ultrasonido y evaluación de sus propiedades hipoglucémicas y antiobesidad.
- Hinsley, A., Nuno, A., Ridout, M., John, F. A. S., y Roberts, D. L. (2017). Estimating the Extent of CITES Noncompliance among Traders and End-Consumers; Lessons from the Global Orchid Trade. *Conservation Letters*, 10, 602-609.
- Hinsley, A., Verissimo, D., Roberts, D. L. (2015). Heterogeneity in consumer preferences for orchids in international trade and the potential for the use of market research methods to study demand for wildlife. *Biological Conservation*, 190, 80-86.
- Hintze, K. ., Jeffery, E. H ., Finley, J. W., Kong, A., Hintze, K. J. ., Je, E. H., Ji, L. L., and. Lei, X. G (2011). “Antioxidants in Foods : State of the Science Important to the Food Industry Antioxidants in Foods : *State of the Science Important to the Food Industry*,” pp. 6837–6846.
- Hoque, M. M., Huda, M. K., y Eva, T. A. (2021). PHARMACOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF AN ENDANGERED EPIPHYTIC ORCHID,

- PELATANTHERIA INSECTIFERA (RCHB. F.) RIDL. *J. Orchid Soc. India*, 35, 1-7.
- Hosoi, M. (1999). Prostaglandin E (2) has antinociceptive effects through EP (1) receptor in the ventromedial hypothalamus in rats. *Pain*. 83: 221-227.
 - Hossain, M.M., Akter, S., Uddin, S.B. (2020). Screening of Bioactive Phytochemicals in Some Indigenous Epiphytic Orchids of Bangladesh. In: Khasim, S., Hegde, S., González-Arno, M., Thammasiri, K. (eds) *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*. Springer, Singapore. 25 pp- 481-503.
 - Hucho, T. and Levine J. D. (2007), "Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology," *Neuron*, vol. 55, no. 3, pp. 365–376.
 - Huether S, McCance K. (2016). Understanding pathophysiology. 6th edition. *Mosby*. p. 340–2.
 - Hunskaar, S.; Hole, K. (1987). The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*,30, 103–114.
 - Hussain, A., Qarsh, I. A. I., Nazir, H. y Ullah I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant In vitro Culture via Intech Open Access*,1, 1-28.
 - Ibarra Cantún, D. (2017). Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México.
 - Ibarra, E. (2006). Una nueva definición de " dolor": un imperativo de nuestros días. *Revista de la Sociedad Española del dolor*, 13(2), 65-72.
 - Iglesias-Andreu, L. G. (2014). Establecimiento de un Sistema de Biorreactores para la micropropagación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agro Productividad*, 7(3).
 - Ignatavicius D., Workman M.L., (2016) Chapter 3 Assessment and care of patients with pain. *Medical-Surgical nursing: patient-centered collaborative care*. 8th edition St Louis (MO): *Elsevier*; p 24-39.

- Jadhav, S. J. Nimbalkar S. S., Kulkarni A. D. and. Madhavi, D. L (1996). in *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*, ed. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe, Marcel Dekker, New York, pp. 5–64
- Jara Bayona, R. N., & Cusi Garma, G. A. (2020). Evaluación de la actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ophryosporus chilca* (Kunth) Hieron “Shequia
- Jersáková, J., Johnson, S. D. y Kindlmann, P. (2006). Mecanismos y Evolución de la polinización engañosa en orquídeas. *Revisiones biológicas*, 81, 219–235.
- Jiménez-López, D., A, Solano, R., Peralta-Carreta, C., Solórzano, J., V, Chávez-Ángeles, M., G. (2019). Species richness may determine the income from illicit wild orchid trading in traditional markets in Mexico. *Economic Botany* 73: 171-186.
- Joffard, N., Massol, F., Grenié, M., Montgelard, C., & Schatz, B. (2019). Effect of pollination strategy, phylogeny and distribution on pollination niches of Euro-Mediterranean orchids. *Journal of Ecology*, 107(1), 478-490.
- Jorge, P., y Troncoso, L. (2016). Capacidad antioxidante del fruto de la *Opuntia apurimacensis* (ayrampo) y de la *Opuntia ficus-indica* (tuna). In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 77, No. 2, pp. 105-109). UNMSM. Facultad de Medicina.
- Julius, D., and Basbaum, A. (2001). Mecanismos moleculares de la nocicepción. *Nature* 413, 203–210.
- Keshava, C., Keshava, N., Ong, T. M., & Nath, J. (1998). Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 397(2), 149-159.

- Kinghorn, A. D., Pan, L. Fletcher, J. N. y Chai, H. (2011) "La relevancia de las plantas superiores en los programas de descubrimiento de compuestos de plomo", *Journal of Natural Products*, 74, no. 6, pp. 1539-1555.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457.
- Koster, R. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*18, 412–414.
- Kowalski, J. L., Morse, L. R., Troy, K., Nguyen, N., Battaglino, R. A., Falci, S. P., & Linnman, C. (2023). Resting state functional connectivity differentiation of neuropathic and nociceptive pain in individuals with chronic spinal cord injury. *NeuroImage: Clinical*, 38, 103414.
- Kumar N, Redd MP (2011). *In vitro* plant propagation: a review. *J For Sci* 27:61–72.
- Kumar SP, Saha S. (2011). Mechanism-based Classification of Pain for Physical Therapy Management in Palliative care: A Clinical Commentary. *Indian J Palliat Care*. (1):80-6.
- Kundu, A., & Mitra, A. (2013). Flavoring extracts of *Hemidesmus indicus* roots and *Vanilla planifolia* pods exhibit *in vitro* acetylcholinesterase inhibitory activities. *Plant foods for human nutrition*, 68, 247-253.
- Lamas, N. M. A. (2012). Producción de vainilla en invernaderos. El economista Recuperado de: <https://www.economista.com.mx/opinion/Produccion-de-vainilla-en-invernaderos-20120117-0010.html>.
- Leal-García, I., Qui-Zapata, J. A., Ávila-Miranda, M. E., Andrade-González, I., y Montero-Cortés, M. I. (2022). Germinación y Desarrollo de Plántulas de Café en Biorreactores. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 9, 117-125
- Lee, I. S., Cheon, S., & Park, J. Y. (2019). Central and peripheral mechanism of acupuncture analgesia on visceral pain: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

- Lindsey, K., & Jones, M. G. K. (1989). Stable transformation of sugarbeet protoplasts by electroporation. *Plant cell reports*, 8, 71-74.
- Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, Singhirunnusorn P, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki I. (2005). Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci.*;25(1):57-65.
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12824.
- Llanos Buendia (2015). Micropropagación *in vitro* de piña, *Ananas comosus* (L.) Merr Var. MD2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*
- Lome B. Acute pain and critically ill trauma patient. *Crit Care Nurs Q* 2005;28(2): 200–7.
- Londoño Londoño, J. A. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- López Cruz, J. I. (2024). Evaluación de fenoles volátiles, polifenoles totales y capacidad antioxidante de vainilla de diferentes especies.
- López-Alarcón, C. and Denicola, A. (2013). "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays," *Anal. Chim. Acta*, vol. 763, pp. 1–10.
- Loyola-Vargas V., M, Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant cell culture protocols*. Springer, New York, NY, pp 3–13.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J., Kim, S. C. y Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Econ. Bot*, 62, 127–138.

- Lujan-Carpio, E., Pante-Medina, C. y Salazar-Granara, A. (2018). Dosis respuesta en la actividad analgésica periférica de la metformina en la prueba de contorsiones abdominales en ratones. *Horizonte Médico*, 18: (2).
- Luna-Guevara, J., Luna-Guevara, M., Cruz-Díaz, Y., Leyva-Abascal, J., Silva, L., Herrera-Cabrera, B. (2016). Medidas y límites de control durante el proceso de beneficiado de *Vainilla planifolia* Jacks ex. Andrews. *A Pago*, 9,49-50.
- Magaña, J. C. A., Velázquez, J. H. C., Chan, M. A. C., López, J. E. V., & Montero, J. A. R. (2019). Biofábricas y biorreactores de inmersión temporal: Propagación *in vitro* de *Anthurium andreaum* L., y su viabilidad económica. *Agro Productividad*, 12(10).
- Mahendran, G. y Narmatha Bai, V. (2015). An efficient *in vitro* propagation, antioxidant and antimicrobial activities of *Aphyllorchis montana* Rchb.f. *Plant Biosystems*, 150, 1087-1095.
- Maldonado-Miranda, J.J., Carranza-Álvarez C., y Alonso-Castro, A. J. (2023). Tendencias de Biotecnología, Medioambiente y Sociedad.
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry*, 299, 125124.
- Martínez-Oviedo, L.M., Mercado-Leguía, K.J., Beltrán-Herrera, J.D. y Ortega-Macareno, L.C. (2024). Establecimiento *in vitro* y control de Oxidación de segmentos nodales de *Arrabidaea chica* Verlot. *Temas Agrarios* 29(1): 9-21.
- Maurya, D.k., Adhikari S, Nair CK. (2007). Devasagayam TP. DNA protective properties of vanillin against gamma-radiation under different conditions: possible mechanisms. *Mutat Res.* 1;634(1- 2):69-80
- Máximo, W.P.F., Santos, P.A.A., Martins, G.S., Mendonça, E.G., Paiva, L.V., (2018). Multiplicación *in vitro* de híbridos de *eucalipto* mediante

- biorreactor de inmersión temporal: medios de cultivo y efectos de las citoquininas. *Biotechnol de la aplicación de la raza del cultivo*; 18: 131-138.
- McCleskey EW, Gold MS.(1999). Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61:835.
 - McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13525–13530.
 - Melo, M. G., Araújo, A. A., Rocha, C. P., Almeida, E. M., Siquiera, R. S., Bonjardim, L.R., Quintans, L.J. Jr. (2008). Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladonia kalbii*. *Biol Pharm Bull.* (10):1977-80.
 - Mencias Méndez, H. F., y Salazar Ponce, T. F. (2018). *Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros epidendrum, oncidium y caucea* (Bachelor's thesis).
 - Méndez Alegría, A. Y. (2014). *Uso de recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA) para la micropropagación comercial de vainilla empleando nanopartículas de plata* (Bachelor's thesis).
 - Merskey H, Bogduk N. (1994). Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. Report by the International Association for the Study of Pain Task Force on Taxonomy, 2 ed. Seattle: IASP.
 - Morales-López, (2021). *Aclimatación Simbiótica de Vanilla Planifolia Jack. ex Andrews*. [Tesis de Licenciatura no publicada]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
 - Moreno-Jiménez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M. a., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F. , Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., and RamosGomez, M. (2015). "Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.)

- infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 80, pp. 144–153.
- Muñíz, R. (2018). La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable. *Tekhné*, 21(3).
 - Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.
 - Nahar, M., Hasan, W., Rajak, R., & Jat, D. (2017). Oxidative stress and antioxidants: An overview. *Int. J. Adv. Res. Rev.* 2, 110–119.
 - Navarrete Yáñez, M. E., Vogel, H., & Muñoz Espinoza, V. A. (2019). *Multiplificación in vitro de Aristotelia chilensis en sistema de inmersión temporal SETIS* (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía.
 - Novoa, Y. G. (2020). Orquídeas las orquídeas y su acción parasitaria, un nuevo cambio en su apreciación tradicional: las orquídeas y su acción parasitaria, un nuevo cambio en su apreciación tradicional. *Encuentro SENNOVA del Oriente Antioqueño*, 6(1).
 - Ontaneda, A. L. C., Herrera, A. M., & Batista, R. M. G. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173-182.
 - Padgaonkar, A. V., Suryavanshi, S. V., Londhe, V. Y., y Kulkarni, Y. A. (2018). Acute toxicity study and anti-nociceptive activity of *Bauhinia acuminata* Linn. leaf extracts in experimental animal models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 60–66.
 - Padgaonkar, A. V., Suryavanshi, S.V. Londhe, V.Y. Kulkarni, Y.A. (2018). *Acute toxicity study and anti-nociceptive activity of Bauhinia acuminata Linn. leaf extracts in experimental animal models. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97(), 60–66.

- Palma Mora, H. M. (2020). *Influencia de reguladores de crecimiento para aumentar los rendimientos en cultivos de ciclo corto* (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2020).
- Palma, E. J. R., & Soto, V. G. (2020). La percepción del dolor. *Milenaria, Ciencia y arte*, (16), 16-18.
- Pant, B. (2014). Application of Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Phytochemicals in Medicinal Plants. *Infectious Diseases and Nanomedicine II*, 25–39
- Pant, B., Joshi, P. R., Maharjan, S., Thakuri, L. S., Pradhan, S., Shah, S., ... & Pant, B. (2021). Comparative cytotoxic activity of wild harvested stems and *in vitro*-raised protocorms of *Dendrobium chryseum* Rolfe in human cervical carcinoma and glioblastoma cell lines. *Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences*,
- Pardo de Santayana, M., y Gómez Pellón, E. (2002). Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural.
- Payá, C., Vazquez, F., Galarza, P., Perez, J., Bellés Albert, J. M., Lisón Párraga, P., ... & Rodrigo, I. (2021). Papel primario del metabolismo secundario en la respuesta defensiva de las plantas.
- Pérez Fuentes, J. (2020). Versión actualizada de la definición de dolor de la IASP: un paso adelante o un paso atrás. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 27(4), 232-233.
- Pérez Gutiérrez, R. M., Anaya Sosa, I., Hoyo Vadillo, C., & Victoria, T. C. (2011). Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharmaceutical biology*, 49(11), 1121-1127.
- Pérez-Silva, A., Gunata, Z., Lepoutre, J. P., Odoux, E. 2011. New insight on the genesis of odor active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food Research International*. 44: 2930-2937.

- Petrolli, R., Zinger, L., Perez-Lamarque, B., Collobert, G., Griveau, C., Paillet, T., *et al.* (2022). Spatial turnover of fungi and partner choice shape mycorrhizal networks in epiphytic orchids. *J. Ecol.* 110, 2568–2584. doi: 10.1111/1365-2745.13986.
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 242-257.
- Pineda-Lozano, J. E., López-Espinoza, A., Virgen-Carrillo, C. A., Martínez-Moreno, A. G., & Valdés-Miramontes, E. H. (2021). Compuestos fenólicos y su efecto en las dislipidemias en seres humanos: Una revisión sistemática. *Revista chilena de nutrición*, 48(2), 276-285.
- Pozo, S. O., y Trabanco, P. J. L. (2015). Patrones que caracterizan la relación orquídea-forofito en la Reserva de la Biosfera" Sierra del Rosario". *Avances*, 15(3), 253-264.
- Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J. A., y Molina-Torres, J. (2004). Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1), 19-36.
- Primitivo, M. J., Neves, M., Pires, C. L., Cruz, P. F., Brito, C., Rodrigues, A. C., y Ribeiro, V. S. (2022). Flores comestibles de *Helichrysum italicum*: composición, valor nutritivo y bioactividades. *Food Research International*, 157, 111399.
- Prochazkova, D., Bousova, I., Wilhelmova, N., (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523.
- Puebla Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS: Dolor iatrogénico. *Oncología (Barcelona)*, 28(3), 33-37.
- Quino, C. F., Espinoza, D. M., Herreros, C. G., Miranda, G. C., Piña, L. C., Ortiz, E. G., y Calderón, O. H. (2016). Características fitoquímicas y capacidad antioxidante *in vitro* de Aloe vera, Plukenetia volubilis, Caiophora carduifolia, Cecropia membranacea. In *Anales de la Facultad de*

Medicina (Vol. 77, No. 1, pp. 9-13). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Rain, P. (2004) *Vanilla: The Cultural History of the World's Favorite Flavor and Fragrance*. New York, *Penguin Group*.
- Ramesh, M., Rao, Y. N., Rao, A. A., Prabhakar, M. C., Rao, C. S., Muralidhar, N., y Reddy, B. M. (1998). Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de un flavonoide aislado de *Caralluma attenuata*. *Revista de etnofarmacología*, 62(1), 63-66.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(2), 154–160.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., e Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123, 657-664.
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Bello-Bello, J.J. (2021). El biorreactor SETIS™ aumenta *in vitro* la multiplicación y la longitud de los brotes en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews). *Acta Physiol Plant* 43, 52.
- Ramos, P., Colareda, G. A., Rosella, M. A., Debenedetti, S. L., Spegazzini, E. D., & Consolini, A. E. (2012). Phytochemical profile and anti-inflammatory effect of the orchid *Catasetum macroglossum*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(1), 62-7.
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L.G., Bello-Bello, J. *et al.* (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 50, 576.

- Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2018). The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid–tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 456-472.
- Rendón Martínez, J. (2023). Efecto de las galphiminas GA y GE en el ensayo de edema plantar inducido con carragenina.
- Reyes-López, D., Flores-Jiménez, Á., Huerta-Lara, M., Kelso-Bucio, H. A., Avendaño-Arrazate, C. H., Lobato-Ortiz, R., ... & López-Olguín, J. F. (2014). Variación morfológica de fruto y semilla en cuatro especies del género *Vanilla*. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 205-218.
- Reyes-López, D., Rodríguez, B., Kelso, H., Huerta, M., y Ibañez, A. (2008). Beneficiado tradicional de vainilla. Editorial Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.
- Ribeiro, R. A., Vale, M. L., Thomazzi, S. M., Paschoalato, A. B., Poole, S., Ferreira, S.H., *et al.* (2000). Implicación de macrófagos residentes y mastocitos en la respuesta nociceptiva retorcida inducida por el ácido zymosan y acético en ratones. *Eur J Pharmacol.* 387:111–8.
- Rodríguez-López, T., & Martínez-Castillo, J. (2019). Exploración actual sobre el conocimiento y uso de la vainilla (*vanilla planifolia* Andrews) en las Tierras Bajas Mayas del Norte, Yucatán, México. *Polibotánica*, (48), 169-184.
- Rosales, M. S. D., Jiménez, M. D. L. L. G., Gómez, C. R., Valles, C. Q., de León, S. D. D., Ordaz, S. J. M., y Balch, E. P. M. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16, 53-62.
- Rosenquist, E. W. K., Aronson, M. D., & Crowley, M. (2015). Definition and pathogenesis of chronic pain. *UpToDate. MD Aronson, L.*
- Routray, W., and Orsat, V. (2012). "Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 409–424.

- Ruiz Roca, B. (2009). Propiedades antioxidantes de los productos de la reacción de Maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales.
- Sahagún, B., 1975. Historia General de las Cosas de Nueva España. Editorial Porrúa. México, pp. 508-685.
- Sailo, N., Rai, D., & De, L. C. (2014). Physiology of temperate and tropical orchids-an overview. *Int. J. Sci. Res*, 3, 3-8.
- Salas-Pérez, L., Moncayo-Lujan, M. D. R., Borroel-García, V. J., Guzmán-Silos, T. L., & Ramírez-Aragón, M. G. (2022). Composición fitoquímica y actividad antioxidante en tres variedades de albahaca por efecto de distintos solventes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(SPE28), 113-123.
- Salminen J-P, Karonen M (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology* 25: 325-338. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01826.
- Sandrasagaran, U. M., Subramaniam, S. y Murugaiyah, V. (2014). Nueva perspectiva de la orquídea *Dendrobium crumenatum* para la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas seleccionadas. *Pak J Bot*, 46(2), 719-724.
- Sarak, A. S., Dawane, J. S., & Pandit, V. A. (2022). Experimental evaluation of anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Vanilla planifolia* seeds in Wistar rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 12(7), 937-942.
- Schnorr Vargas, A. J. (2019). EFECTO DE LOS FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS DE MANZANA (PRINCESA AND TERPENES) SOBRE SUS PROPIEDADES FITOQUÍMICAS (FENOLES Y TERPENOS) EN EL HUERTO "TIQUIPAYA". *Orbis Tertius - UPAL*, 3(5), 33-62.
- Schuster, R., Zeindl, L., Holzer, W., Khumpirapang, N., Okonogi, S., Viernstein, H., Mueller, M. (2017). *Eulophia macrobulbon* - an orchid with

significant antiinflammatory and antioxidant effect and anticancerogenic potential exerted by its root extract. *Phytomedicine*, 24, 157-165.

- Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, 2, 5-8.
- Selosse, M. A., Petrolli, R., Mujica, M. I., Laurent, L., Perez-Lamarque, B., Figura, T., Bourceret, A., Jacquemyn, H., Li, T., Gao, J., Minasiewicz, J., & Martos, F. (2022). The waiting room hypothesis revisited by orchids: Were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany*, 129, 259– 270.
- SEMARNAT (2010). NOM-059-SEMARNAT-2010 “Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo”. Diario Oficial de la Federación. México
- Shailly, G., Mathew, G., Manmohan, S., Ganesh, N., Vikas, G. (2010). Leaves extract of *Murraya koenigii* Linn for anti-inflammatory and analgesic activity in animal models. *J Adv Pharm Technol Res.*;1(1):68-77. 20.
- Sharry, S.; Adema, M. y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Coordinación general: Sandra Sharry; Marina Adema; Walter Abedini.
- Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., & Hüttemann, M. (2015). Molecular mechanisms and therapeutic effects of (–)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Shefferson, Richard P; Jacquemyn, Hans; Kull, Tiiu; Hutchings, Michael J (2019). *La demografía de las orquídeas terrestres: historia de vida, dinámica poblacional y conservación*. *Revista Botánica de la Sociedad Linneana*.
- Shen, J. y Su, Z. (2021). La vainillina oxima inhibe la proliferación de células de cáncer de pulmón y activa la apoptosis a través de la vía JNK / ERK-

CHOP. *La revista coreana de fisiología y farmacología: revista oficial de la Sociedad Coreana de Fisiología y la Sociedad Coreana de Farmacología*, 25 (4), 273–280.

- Shinde U. A., Phadke A. S., Nair A. M., Mungantiwar A. A., Dikshit V. J., Saraf M. N., J. (1999). *Ethnopharmacol.*, 65, 21—27.
- Shrestha, M., Dyer, A. G., Dorin, A., Ren, Z. X., & Burd, M. (2020). Rewardlessness in orchids: how frequent and how rewardless?. *Plant Biology*, 22(4), 555-561
- SIAP. (2021). Sistema de Información Agroalimentaria y Consulta. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SADER. México. <https://www.gob.mx/siap/prensa/sistema-de-informacion-agroalimentaria-de-consulta-siacon>.
- Solano-Gómez, R., Cruz-Lustre, A. Martínez-Feria, y L. Lagunez-Rivera, (2010). “Plantas utilizadas en la celebración de la semana santa en Zaachila, Oaxaca, México”. *Polibotánica*, 29: 263-279.
- Soto, M. A., & Dressler, R. L. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla plumier* ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 9, 285-354.
- Soto-Arenas, M. and Dressler, R.L. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanillaplumier* ex Miller with a characterization of their region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*, 9, 285-354.
- Soto-Arenas, M.A. (1999). Fitogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Project J101, CONABIO, México.
- Sreedhar, B., Reddy, P. S., & Devi, D. K. (2009). Direct one-pot reductive amination of aldehydes with nitroarenes in a domino fashion: Catalysis by gum-acacia-stabilized palladium nanoparticles. *The Journal of Organic Chemistry*, 74(22), 8806-8809.

- Sun, R., Sacalis, J.N., Chin C-K., Still CC. (2001). Bioactive aromatic compounds from leaves and stems of *Vanilla fragrans*. *J Agric Food Chem* 49:51615164
- Téllez Torres, A. G., Jiménez Rodríguez, J. Á., González Caballero, O., Juárez Pérez, W. R., Martínez Martínez, S., & Chávez Avila, V. M. (2023). Cultivo *in vitro* de *Agave potatorum*, especie amenazada endémica de México. *Botanical Sciences*, 101(3), 883-894.
- Tjolsen A., Berge O. G., Hunskaar S., Rosland J. H., Hole K. (1992). Pain, Review article.
- Tomás-Barberan, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud* 10(2):41-53.
- Trejo-Salazar, R. E., Scheinvar, E. y Eguiarte, L. E. (2015). ¿Quién poliniza realmente los agaves? Diversidad de visitantes florales en 3 especies de *Agave* (*Agavoideae: Asparagaceae*). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86: 358-369.
- Trevor A. Thorpe (2007). *History of plant tissue culture*. 37(2), 169–180.
- Trinidad-García, (2020). Manejo y conservación de *Vanilla planifolia* en sistemas agroforestales tradicionales de la Huasteca Potosina. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de San Luis Potosí] Repositorio Institucional Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Trujillo, I., Subero, B., y Silva, A. (2019). Conservación *in vivo* e *in vitro* de germoplasma vegetal en escuelas de los Altos Mirandinos. *Tekhné*, 22(1).
- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M., y Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque (Valdivia)*, 29, 58-64.
- Van Dorsten, F. A., Peters, S., Gross, G., Gomez-Roldan, V., Klinkenberg, M., De Vos, R. C., ... & Jacobs, D. M. (2012). Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and

- colon-region dependent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(45), 11331-11342.
- Varela, H. A. (2023). Cultivo de tejidos y células vegetales como estrategia biotecnológica para la producción de compuestos bioactivos. *Revista de divulgación científica iBIO*, 5(1), .
 - Vargas-Hernández, J. (2014). Producción de Vainilla en tres sistemas de producción en la sierra de la huasteca potosina. San Luis Potosí. Editorial. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, agrícolas y Pecuarias*.
 - Vásquez, M. A., Castro, A., y Ramos, N. (2017). Composición química, polifenoles y actividad antioxidante del extracto etanólico de *Gentianella dianthoides* (kunth) fabris. *Científica (descontinuada)*, 14(2), 19-27.
 - Velasco, V. M. (2014). Dolor neuropático. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(4), 625-634.
 - Vergara-Galicia, J., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S. (2013). Vasorelaxant effect of *Laelia speciosa* and *Laelia anceps*: Two orchids as potential sources for the isolation of bioactive molecules. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), 034-037.
 - Vergara-Galicia, J., Ortiz-Andrade, R., Rivera-Leyva, J., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., ... & Estrada-Soto, S. (2010). Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. *Fitoterapia*, 81(5), 350-357.
 - Vijaybabu, K., Punnagai, K. (2019). Efectos antiproliferativos *in vitro* del extracto etanólico de extracto de hoja de *vainilla planifolia* contra células de carcinoma epidermoide humano A431. *Revista de Biomédica y Farmacología*, 12 (3), 1141-1146.
 - Villanueva-Tiburcio, J. E., Condezo-Hoyos, L. A., y Asquieri, E. R. (2010). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en

la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh). *Food Science and Technology*, 30, 151-160.

- Villegas-Ramírez, J. G. (2021). Empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) para la multiplicación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) y su caracterización morfogénica.
- Villegas-Ramírez, J., & Palma-Zúñiga, T. (2022). Caracterización morfogénica de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) para su propagación. *Agronomía Costarricense*, 46(1), 9-24.
- Wang Q, Zi C-T, Wang J, Wang Y-N, Huang Y-W, Fu X-Q, Wang X-J and Sheng J (2018) *Dendrobium officinale* Orchid Extract Prevents Ovariectomy-Induced Osteoporosis *in vivo* and Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Differentiation *in vitro*. *Front. Pharmacol.* 8:966.
- Wang, D., Jacquemyn, H., Gomes, S. I. F., Vos, R. A., & Merckx, V. S. F. T. (2021). Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae. *New Phytologist*, 231, 791– 800
- Wani, I. A., Kumar, V., Verma, S., Tasleem Jan, A., & Rather, I. A. (2020). *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo: A critically endangered perennial orchid from the North-West Himalayas. *Plants*, 9(12), 1644.
- Wen, W., Alseekh, S., & Fernie, A. R. (2020). Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Current opinion in plant biology*, 55, 100-108.
- Willis, K.J. (2017). Editor. *Estado de las plantas del mundo 2017. Informe*. Kew: Real Jardín Botánico
- Yáñez-Barrientos, E., González-Ibarra, A. A., Wrobel, K., Wrobel, K., Corrales-Escobosa, A. R., Alonso-Castro, A. J., & Zapata-Morales, J. R. (2022). Antinociceptive effects of *Laelia anceps* Lindl. and *Cyrtopodium macrobulbon* (Lex.) GA Romero & Carnevali, and comparative evaluation of their metabolomic profiles. *Journal of Ethnopharmacology*, 291, 115172.

- Zapata, L. M., Gerard L., Davies C. y Schvab M. C. (2007). Estudio de los componentes y actividad antioxidantes en tomates. *Ciencia Docencia y Tecnología* 18(35);175-193.
- Zendehtel, M., Taati, M., Jadidoleslami, M., and Bashiri, A. (2011). "Evaluation of pharmacological mechanisms of antinociceptive effect of *Teucrium polium* on visceral pain in mice," *Iranian Journal of Veterinary Research*, vol. 12, no. 4, pp. 292–297.
- Zhao, K.; Yuan, Y.; Lin, B.; Miao, Z.; Li, Z.; Guo, Q.; Lu, N. LW-215, (2018). A newly synthesized flavonoid, exhibits potent anti-angiogenic activity *in vitro* and *in vivo*. *Gene* , 642, 533–541.
- Zhao, L.; Yuan, X.; Wang, J.; Feng, Y.; Ji, F.; Li, Z.; Bian, J. (2019). A review on flavones targeting serine/threonine protein kinases for potential anticancer drugs. *Bioorganic Med. Chem.* 27, 677–685.
- Zotz, G. (2016). Physiological ecology. In: Zotz, G. (ed.). *Plants on plants - The biology of vascular epiphytes*. Springer. Cham, Switzerland. Pp. 95-137.