



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Determinación de compuestos fenólicos en extractos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth, y su caracterización por espectroscopia infrarroja”

**Proyecto de investigación previo a la obtención del
título de Bioquímica Farmacéutica**

Autoras:

Hirma Beatriz Pacho Montaleza C.I.: 0105544696

Correo electrónico: miriamep2010@hotmail.com

Johanna Alexandra Valverde Loja C.I.: 0105096788

Correo electrónico: jhomyalexa_3@hotmail.com

Tutora:

Dra. María Elena Cazar Ramírez Phd

C.I.: 0602243800

Cuenca-Ecuador

28-febrero-2020



RESUMEN

Macleania rupestris Kunth es una especie nativa del Ecuador que además de servir como alimento tiene potenciales medicinales. No obstante, son escasos los estudios relacionados al potencial nutracéutico de esta planta. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth (joyapa) y caracterizarlos mediante Espectroscopía Infrarroja, con el fin de caracterizar el tipo de compuestos fenólicos presentes en su fruto. Para el efecto se analizaron extractos y fracciones obtenidos por métodos de maceración y Soxhlet y fraccionados mediante columnas a gravedad y bajo presión. Mediante espectroscopía UV-visible se determinó la concentración de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, flavonoides por el método colorímetro empleando Cloruro de Aluminio hexa-hidratado y antocianinas por el método del pH diferencial. El análisis de espectros infrarrojos permitió la identificación de grupos funcionales presentes en fracciones de diferente polaridad correspondientes a grupos hidroxilo, grupos aromáticos y éster. Estos grupos funcionales forman parte de los compuestos polifenólicos metabolizados por plantas.

Los ensayos de cuantificación de fenoles totales, flavonoides y antocianinas en fracciones y extractos determinaron concentraciones significativas de los metabolitos fenólicos. Por consiguiente, es posible revelar la presencia de estos compuestos con la actividad antioxidante demostrada en ensayos “in vitro”. Los resultados obtenidos demuestran el potencial de *Macleania rupestris* como fruto nutracéutico, dados los beneficios que representa el consumo de alimentos ricos en antioxidantes.

Palabras clave: *Macleania rupestris*. Compuestos fenólicos. Antocianinas. Espectroscopia infrarroja.



ABSTRACT

Macleania rupestris Kunth is a native species to Ecuador that also serves as food has medicinal potentials. However, there are few studies related to the nutraceutical potential of this plant. The objective of this study was to determine the presence of phenolic compounds in the extracts and fractions of *Macleania rupestris* Kunth (joyapa) and characterize them by Infrared Spectroscopy, in order to characterize the type of phenolic compounds present in its fruit. For this purpose, extracts and fractions obtained by maceration methods and Soxhlet and divided by gravity and under pressure columns were analyzed. UV-visible spectroscopy determined the concentration of total phenols by the Folin-Ciocalteu method, flavonoids by the colorimeter method using hexa-hydrated Aluminium Chloride and anthocyanins by the differential pH method. The Infrared spectrum analysis allowed the identification of functional groups present in fractions of different polarity corresponding to hydroxyl, aromatic and ester groups. These functional groups are part of the polyphenolic compounds metabolized by plants.

Quantification assays of total phenols, flavonoids and anthocyanins in fractions and extracts determined significant concentrations of phenolic metabolites. Therefore, it is possible to reveal the presence of these compounds with the antioxidant activity demonstrated in "in vitro" assays. The results obtained demonstrate the potential of *Macleania rupestris* as a nutraceutical fruit, given the benefits of consuming foods rich in antioxidants.

Keywords: *Macleania rupestris*. Phenolic compounds. Anthocyanins. Infrared spectroscopy.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general:	2
Objetivos Específicos:	2
Hipótesis:	2
I. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Estrés Oxidativo	3
1.2 Radicales Libres	3
1.2.1 Factores exógenos que contribuyen a la formación de radicales libres	4
1.2.2 Clasificación de Radicales libres	4
1.2.3 Especies reactivas de oxígeno (EROS)	4
1.3 Antioxidantes	5
1.4 Clasificación de antioxidantes	6
1.5 Compuestos fenólicos	7
1.5.1 Flavonoides	8
1.5.2 Antocianinas	10
1.6 Familia <i>Ericaceae</i>	13
1.7 <i>Macleania rupestris</i> Kunth	13
1.7.1 Características morfológicas	14
1.7.2 Usos de <i>Macleania rupestris</i>	15
1.8 Espectroscopia Infrarroja	15
1.8.1 Identificación de grupos funcionales por Espectroscopia Infrarroja	16
II. METODOLOGÍA	17
2.1 Obtención de las muestras	17
2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos	17
2.2.1 Determinación cuantitativa de Fenoles Totales	17
2.2.2 Determinación del contenido de Flavonoides Totales	18
2.2.3 Determinación del contenido de antocianinas	19
2.2.4 Identificación de componentes mayoritarios por Espectroscopia Infrarroja (FTIR)	21
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Determinación de Fenoles Totales	22
3.2 Determinación de Flavonoides Totales	24
3.3 Determinación de Antocianinas	26



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.4 Caracterización de grupos funcionales	30
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
4.1 CONCLUSIONES.....	37
4.2 RECOMENDACIONES.....	38
V. REFERENCIAS.....	39
VI. ANEXOS.....	44



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Antioxidantes	6
Tabla 2. Antocianidinas más comunes	12
Tabla 3. Descripción taxonómica de <i>Macleania rupestris</i>	14
Tabla 4. Concentraciones de fenoles totales en extractos de <i>M. rupestris</i>	22
Tabla 5. Concentraciones de fenoles totales en fracciones de extractos de <i>M. rupestris</i>	23
Tabla 6. Concentraciones de flavonoides totales en extractos de <i>M. rupestris</i>	24
Tabla 7. Concentraciones de flavonoides en fracciones de extractos de <i>M. rupestris</i>	25
Tabla 8. Concentraciones de antocianinas en extractos de <i>M. rupestris</i>	26
Tabla 9. Concentraciones de antocianinas en fracciones de extractos de <i>M. rupestris</i>	28
Tabla 10. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 60%- Metanol 40%	31
Tabla 11. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 80%- Metanol 20%	32
Tabla 12. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 40%-Metanol 60%	33
Tabla 13. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 20%-Metanol 80%	33
Tabla 14. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Metanol 100%	34
Tabla 15. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 20%-Metanol 80%	35
Tabla 16. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Metanol 100%	35



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los flavonoides.....	8
Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides.	9
Figura 3. Estructura química de las antocianinas.....	10
Figura 4. Estructura de las antocianidinas indicando la posición de los sustituyentes en el anillo B.....	11
Figura 5. Arbusto de <i>Macleania rupestris</i> Kunth.	15



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Muestras empleadas para el análisis de compuestos fenólicos en donde se describe el método de extracción y fraccionamiento. 44

Anexo 2. Fracciones y extractos secos de *Macleania rupestris* empelados en los ensayos. 45

Anexo 3. Solución madre de las muestras con metanol, usados para la determinación de fenoles totales, flavonoides y antocianinas..... 45

Anexo 4. Placas usadas para la elaboración de la curva de calibración de ácido gálico necesaria para la determinación de fenoles totales en los extractos y fracciones de *M. rupestris* 45

Anexo 5. Placas usadas para la determinación de fenoles totales de extractos y fracciones de *M. rupestris* realizado por triplicado..... 46

Anexo 6. Soluciones diluidas de extractos y fracciones, y soluciones estándar empleados para la determinación de flavonoides 46

Anexo 7. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales, empleándose ácido gálico como patrón estándar 47

Anexo 8. Curva de calibración para la determinación de flavonoides, empleándose quercetina como patrón estándar 47

Anexo 9 y 10. Tablas estandarizadas para la interpretación de espectros infrarrojos..... 48

Anexo 11. Lista de Abreviaturas 50



Cláusula de Propiedad Intelectual

Hirma Beatriz Pacho Montaleza, autora del trabajo de titulación "Determinación de compuestos fenólicos en extractos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth y su caracterización por espectroscopia infrarroja", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 28 de febrero de 2020

Hirma Beatriz Pacho Montaleza

C.I: 0105544696



Cláusula de Propiedad Intelectual

Johanna Alexandra Valverde Loja, autora del trabajo de titulación "Determinación de compuestos fenólicos en extractos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth y su caracterización por espectroscopia infrarroja", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 28 de febrero de 2020

Johanna Alexandra Valverde Loja

C.I: 0105096788



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Hirma Beatriz Pacho Montaleza en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de compuestos fenólicos en extractos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth y su caracterización por espectroscopia infrarroja", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de febrero de 2020

Hirma Beatriz Pacho Montaleza

C.I: 0105544696



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Johanna Alexandra Valverde Loja en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de compuestos fenólicos en extractos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth y su caracterización por espectroscopia infrarroja", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de febrero de 2020

Johanna Alexandra Valverde Loja

C.I: 0105096788



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por brindarme perseverancia, fortaleza y salud en cada uno de las etapas de mi vida estudiantil la misma que me permitió alcanzar mi meta. A Rosa, mi mamá, quien me brindó su apoyo incondicional en cada una de mis etapas de vida. A Marcelo, mi padre, aunque no esté presente, pero sé que desde el cielo estuvo cada instante conmigo y a Andrés, mi hijo quien fue mi fuerza e inspiración para haber alcanzado mi objetivo. A mis amigas, por brindarme su amistad y apoyo con cada una de sus palabras de aliento.

HIRMA P.

Este trabajo lo dedico primeramente a Dios, pues siempre ha estado conmigo guiando mi camino y hoy poder cumplir esta meta. A mis padres Imelda y Gonzalo, quienes son un pilar fundamental en vida, siempre han estado brindándome su apoyo moral y económico. A mis hermanas, por estar siempre a mi lado compartiendo momentos de felicidad y tristeza y sobretodo demostrándome su confianza. A mi esposo Omar, por todo su apoyo, paciencia y cariño para poder culminar mis estudios, pese a las dificultades presentadas, siempre ha estado brindándome su apoyo y amor. A mi hija, Danna por ser mi motor y fuerza para salir adelante en la búsqueda de un futuro mejor. Finalmente, dedico este trabajo a mis amigas por su amistad y compañía a lo largo de estos años.

JOHANNA V.



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por habernos brindado salud, perseverancia, constancia, fe y sabiduría en cada una de las etapas de nuestra vida estudiantil.

A nuestros padres y familia por ser nuestros pilares fundamentales, por brindarnos apoyo incondicional y habernos inculcado valores que fueron la base para alcanzar nuestra meta.

A los profesores de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, por brindarnos sus conocimientos durante los años de aprendizaje.

A nuestra Directora de tesis, Dra. María Elena Cazar, por ser nuestra guía y habernos brindado sus conocimientos, tiempo y paciencia durante la realización de nuestro proyecto.

A nuestros amigos, quienes nos brindaron su amistad, apoyo y alegrías durante todos los años de estudio.

HIRMA P. & JOHANNNA V.



INTRODUCCIÓN

Ecuador se caracteriza por su riqueza en especies vegetales nativas, las cuales producen frutos cuya composición química puede relacionarse con propiedades nutraceuticas, asociadas a beneficios para la salud. Un ejemplo de estos frutos es *Macleania rupestris* Kunth, arbusto que se encuentra distribuido desde México hasta Perú. Esta especie crece en zonas montañosas de los Andes Ecuatorianos y produce un fruto carnoso de coloraciones que varían desde el rosa hasta morado oscuro (De la Torre, L. et al., 2008). La planta es empleada para el tratamiento de diarreas agudas, disentería y fiebre tifoidea. Los frutos se consumen en fresco y se utilizan para la elaboración de mermeladas (Corzo Barragán, 2014).

Los frutos de *Macleania rupestris* deben su coloración a la presencia y concentración de compuestos polifenólicos. Los compuestos polifenólicos poseen en su estructura química un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Estas características químicas están asociadas con propiedades funcionales y actividades biológicas. Los polifenoles presentan efectos antioxidantes que van dirigidos a proteger a la célula del daño oxidativo causado por la sobreproducción de radicales libres. Es por ello que la terapia antioxidante de origen natural se ha convertido en una alternativa para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Se sabe que *Macleania rupestris* Kunth sintetiza compuestos polifenólicos (flavonoides, antocianinas, taninos, etc.), que actúan contra los radicales libres producidos en el organismo y así reducen el daño ocasionado a las biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) (Echavarría, et al., 2009). Por lo tanto, los antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de enfermedades degenerativas; neurológicas, cardiovasculares y cáncer (Ganoza, et al., 2015).

En el presente estudio se determinó el contenido de fenoles totales, antocianinas y flavonoides en extractos orgánicos y fracciones de *Macleania rupestris* Kunth (joyapa). Adicionalmente, se analizaron los espectros infrarrojos de fracciones de extractos del fruto en estudio. Esta información demuestra que este fruto es una fuente natural de antioxidantes, cuyo consumo puede generar efectos beneficiosos para la salud humana.



Objetivo general:

- Asociar la concentración de fenoles totales, antocianinas y flavonoides de extractos y fracciones de *Macleania rupestris* con su actividad antioxidante e identificarlos por espectroscopía infrarroja por Transformadas de Fourier (FT-IR).

Objetivos Específicos:

- Cuantificar el contenido de fenoles totales, antocianinas y flavonoides totales mediante espectroscopía UV-Vis
- Caracterizar grupos funcionales de compuestos orgánicos en fracciones de *M. rupestris*.

Hipótesis: Los extractos metanólicos y fracciones de *Macleania rupestris* contienen compuestos polifenólicos responsables de su actividad antioxidante, los mismos que podrán ser cuantificados mediante espectroscopia UV-visible.



I. MARCO TEÓRICO

1.1 Estrés Oxidativo

En el estrés oxidativo se genera un desbalance entre compuestos pro-oxidantes y antioxidantes. Esta alteración se da a favor de los primeros y produce diversos daños a la célula. El estrés oxidativo afecta principalmente a macromoléculas: en los lípidos se produce una peroxidación lipídica a nivel de la membrana celular, adicionalmente afecta a proteínas y ácidos nucleicos. Estos cambios a nivel celular producen envejecimiento y muerte celular, también originan diversas patologías como el cáncer, enfermedades visuales, cardiovasculares, y neurodegenerativas, desordenes inmunes y envejecimiento prematuro (Coronado H. et al., 2015; Sánchez and Méndez, 2013).

1.2 Radicales Libres

Son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado en su último orbital. Este electrón desapareado hace que la molécula se vuelva inestable y disfuncional (Viada Pupo, et al., 2017). Por consiguiente, los radicales libres son muy reactivos y tienden a reaccionar con varias biomoléculas, con la finalidad de atrapar el electrón faltante. De esta manera se crea una reacción oxidativa en cadena, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical, esta última pasa a ser un Radical Libre (Núñez Sellés, 2011).

Los radicales libres son producidos continuamente por el organismo y son componentes normales de células y tejidos. Participan en varios procesos fisiológicos en el organismo como; producción de energía, regulación del crecimiento celular, síntesis de sustancias biológicas (colágeno y prostaglandinas), defensa de tipo inmune (fagocitosis), señalización intracelular (Corrales and Muñoz, 2012; Núñez Sellés, 2011). La producción excesiva de radicales libres puede ser inactivada por mecanismos enzimáticos, para evitar que produzcan daño a nivel del organismo (Correa Gordillo, et al., 2012).



1.2.1 Factores exógenos que contribuyen a la formación de radicales libres

Entre los principales factores se encuentran: contaminación ambiental (óxidos de nitrógeno), radiaciones de tipo Ultravioleta, hábitos tóxicos (fumar, consumo de alcohol) algunos fármacos y mala alimentación (Venereo Gutiérrez, 2002). El óxido de azufre y nitrógeno provenientes del humo del tabaco pueden reaccionar con la citocromo P450 y con el catabolismo del ácido araquidónico y de las flavonas (Paredes and Roca, 2002).

El ozono (O^3) es un ERO con una potente acción oxidante, puede proceder de; la acción fotoquímica (radiaciones electromagnéticas) sobre el oxígeno, campos eléctricos y la combustión de carburantes. La toxicidad del ozono se alcanza a una concentración de 3 o 4 partes por millón se manifiestan a pocas horas de la exposición.

Cuando la concentración de oxígeno en el aire inspirado excede el 30-40%, las antioxidantes comienzan a fracasar y cuando la concentración alcanza el 100% se vuelve altamente tóxica (Paredes and Roca, 2002).

1.2.2 Clasificación de Radicales libres

Los radicales libres se clasifican de acuerdo a su grupo funcional presente en la molécula; Oxígeno, Nitrógeno, Cloro, Bromo, Tioles, Fósforo entre otros. Los radicales de oxígeno son los de mayor importancia, por su participación en procesos aeróbicos (Corrales and Muñoz, 2012).

1.2.3 Especies reactivas de oxígeno (EROS)

El oxígeno es un compuesto elemental para los seres vivos. En organismos aerobios, el oxígeno incrementa la liberación de energía en forma de Adenosín tri-fosfato mediante procesos de oxidación (mitocondria). El oxígeno puede presentar un efecto nocivo en los seres vivos debido a su reducción parcial, originando moléculas altamente reactivas. Estas moléculas presentan una capa de electrones no apareados y son conocidas como especies reactivas de Oxígeno, pudiendo ser o no radicales libres que concentran su reactividad en un átomo de oxígeno (Sánchez Valle and Méndez Sánchez, 2013).

Las especies reactivas de oxígeno participan en la regulación de procesos celulares; regulación y secreción de insulina, producción de hormonas de crecimiento, citocinas, unión de la proteína G a sus receptores, factores de transcripción, entre otros. Las EROS



al producirse en gran cantidad se vuelven nocivas afectando a constituyentes celulares con la posible muerte celular (Macedo M, 2012). Las EROS que presentan mayor potencial oxidante son: Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), Anión superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), Oxígeno Singlete (1O_2), Óxido Nítrico (NO), Peróxido (ROO) y Ozono (Piña Garza, 1996; Sánchez and Méndez, 2013).

1.2.3.1 Daños que producen las especies reactivas de oxígeno

- ✚ *Lípidos.* La oxidación lipídica se produce a nivel de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, alteran su permeabilidad; esto es la llamada peroxidación lipídica en donde se forman lipo-peróxidos lo que conduce finalmente a la destrucción de la membrana y muerte celular.
- ✚ *Proteínas.* Se da la oxidación de ciertos aminoácidos, produciendo endurecimiento de la cadena peptídica y formación de grupos carbonilo lo que ocasiona una disminución en su función.
- ✚ *ADN.* Los radicales libres atacan los grupos OH de la estructura a nivel de la base o de los azúcares, lo cual provoca alteraciones a nivel de los cromosomas originando mutagénesis y carcinogénesis (Banerjee, et al., 2003).

1.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos químicos que contrarrestan o retrasan la acción de los radicales libres (RL) sobre la oxidación de sustratos que son susceptibles al ataque de dichos radicales, debido a que estos radicales son altamente reactivos e inestables. Los antioxidantes impiden que los RL causen daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, evitando a su vez que produzcan daño a nivel celular. Los antioxidantes actúan donando un electrón a los radicales libres para impedir que se propaguen y alteren a otras moléculas (Coronado H., et al., 2015). El organismo cuenta con un mecanismo antioxidante, mediante la secreción de antioxidantes endógenos. El consumo de antioxidantes exógenos, presentes en productos vegetales, fortalece el mecanismo de defensa ante radicales libres (Coronado H. et al., 2015; Vallejo Zamudio, et al., 2017).



1.4 Clasificación de antioxidantes

Las fuentes de antioxidantes pueden ser: endógena, producidas en el organismo como ciertas enzimas y exógena, como las vitaminas C y E, los carotenoides y compuestos fenólicos, provenientes de los alimentos. Estos antioxidantes protegen al organismo, inhibiendo las EROS, es decir radicales libres (González Calvo and García López, 2012). La tabla 1 se menciona algunos antioxidantes.

Tabla 1. Clasificación de Antioxidantes

<i>Antioxidantes endógenos</i>	<i>Antioxidantes exógenos</i>
<p>Superóxido dismutasa: se encuentra en todas las células (concentración dependiente de actividad metabólica). Cataliza la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno. Disminuyendo los efectos oxidantes del oxígeno a nivel celular y reparando los daños producidos por la oxidación celular (González and García, 2012; Venereo Gutiérrez, 2002).</p> <p>Catalasa: se localiza en los peroxisomas. Protege a las células efecto tóxico del peróxido de hidrógeno presente en los tejidos al catalizar su conversión en oxígeno y agua (Criado Dabrowska and Moya Mir, 2009).</p> <p>Glutación peroxidasa: se encuentra a nivel intracelular, principalmente en el hígado. Aumenta la capacidad de otros antioxidantes. Depende del Adenosín Trifosfato (ATP), considerándose el antioxidante más potente por su relación con la utilización de energía (Carbajal Cabellos and Lezma Julca, 2019).</p>	<p>Vitaminas: C y E: fortalecen el sistema inmunológico.</p> <p>La Vit. E es liposoluble, presente en espinacas, brócoli y aceites vegetales. Protegen la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados a nivel de las membranas celulares. Actúa contra los RL al convertirlos en especies menos reactivas (Berg, 2010).</p> <p>La Vit. C es hidrosoluble, presente en cítricos, potencia el efecto de otros antioxidantes, actúa sinérgicamente con la Vit E.</p> <p>Las dos van a neutralizar al oxígeno singlete y capturar radicales hidroxilos (Castillo, 2019).</p> <p>Carotenoides: presentes en productos de origen vegetal y animal. Los carotenoides de mayor interés son los que presentan actividad de provitamina A (α y β-caroteno presente en la zanahoria), licopeno (tomate), luteína (luteína) y zeaxantina (alfalfa, Maíz).</p> <p>Protegen contra el daño oxidativo, previniendo el desarrollo de enfermedades degenerativas. Neutralizando el oxígeno singlete (Brenes, 2014).</p> <p>Compuestos fenólicos: son metabolitos secundarios de plantas, en este grupo están: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianidinas y taninos. Actúan en la protección contra lesiones celulares, impidiendo el avance de enfermedades degenerativas, cardiovasculares, inflamatorias y el cáncer, al bloquear parcialmente el desarrollo del estrés oxidativo (Carbajal Cabellos and Lezma Julca, 2019).</p>

Fuente. Autoras.



1.5 Compuestos fenólicos

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos, se encuentran los compuestos fenólicos. Estos compuestos se encuentran mayoritariamente en las plantas, son metabolitos secundarios con actividad antioxidante, los cuales se biosintetizan por la vía de Shiquimato o de Fenilpropanoides. Estos compuestos contienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilos. Se caracterizan por ser solubles en soluciones hidroalcohólicas. Algunos son solubles solo en agua como: flavonoides, ácidos fenólicos y quinonas; y los insolubles en agua están: taninos condensados y ligninas (Ignat et al., 2011; Valencia et al., 2017). Los polifenoles se clasifican en los principales grupos: flavonoides: antocianinas, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables o condensados), lignanos, quinonas y estilbenos. Entre las características de estos compuestos está el de actuar en el metabolismo, reproducción, crecimiento y protección contra patógenos. También se les atribuye la coloración y los caracteres sensoriales (astringencia) de vegetales y frutas. Estos compuestos al considerarse antioxidantes de origen natural son potentes agentes químicos beneficiosos para la salud humana (Liu, 2004; Peñarrieta, et al., 2014).

En la planta, la cantidad de polifenoles depende de diferentes factores entre ellos tenemos: área geográfica, suelo, ambiente, grado de madurez y de su genotipo. La madurez influye directamente en el contenido de compuestos bioactivos, dado que durante la madurez se generan procesos de biosíntesis, los que generan mayor contenido de carotenoides, compuestos fenólicos, ácido ascórbico etc.; compuestos bioactivos que al encontrarse en mayor cantidad en el fruto conllevan al aumento de su capacidad antioxidante (Repo de Carrasco and Encina Z., 2008). El incremento en las concentraciones de los compuestos fenólicos pueden deberse a que durante el proceso de maduración, el almidón, principalmente abundante en frutos no climatéricos es hidrolizado a azúcares de manera muy rápida, viéndose favorecida la síntesis del ácido Shiquímico y del ácido Mevalónico precursores de los fenilpropanoides, o bien puede deberse a que durante la maduración se lleva a cabo la hidrólisis de los taninos, aumentando con ello las concentraciones de fenoles libres y por lo tanto la capacidad antioxidante (Di Vaio, et. al, 2008; Robles S., et. al, 2009).

Los compuestos polifenólicos han demostrado diferentes beneficios para la salud por actuar contra diversas enfermedades, en el organismo van intervenir en la inhibición de las vías metabólicas, protección de lesiones a nivel celular, activación del sistema de desintoxicación hepática, es por esto que se los considera antimutagénico, anticarcinogénico y antiaterogénico, también actúan como antivirales y antimicrobianos, agentes protectores de rayos UV. No son considerados nutrientes pero son compuestos de importancia en la dieta del ser humano (Mercado, et al., 2013).

Debido a que nuestro estudio se orienta a la identificación y cuantificación de ciertos compuestos fenólicos: fenoles, antocianinas y flavonoides, se realizará una descripción breve de los mismos.

1.5.1 Flavonoides

1.5.1.1 Características químicas

Son compuestos de bajo peso molecular que presentan la estructura química; $C_6 - C_3 - C_6$ (difencil- pirano), es decir, dos anillos bencénicos unidos por un pirano, una estructura ciclada de tres carbonos unidos a través de un oxígeno. Los átomos de carbono de los anillos A y C son numerados con números ordinales mientras que para el anillo B son numerados con números primos, como se observa en la figura 1. La estructura de los flavonoides da lugar a subclases dependiendo la posición del anillo B y éste a su vez viene dado por la posición o sustitución que le dé el anillo C (Estrada Reyes, et al., 2012).

Los flavonoides pueden encontrarse en formas libres (agliconas- flavonoides) o en mayor cantidad como glucósidos. Se encuentran formando dos tipos de enlaces unidos a los carbohidratos: O- glucósidos, unidos a través de un enlace al oxígeno y C - glucósido, unido a través de un enlace al carbono (Quiñones, et al., 2012)

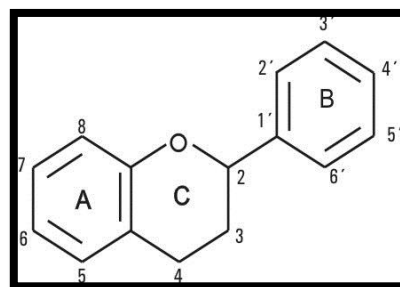


Figura 1. Estructura química de los flavonoides. Fuente. Perez Trueba, 2003.

1.5.1.2 Clasificación

El esqueleto básico de los flavonoides tiene diferentes sustituyentes, por este motivo existe una gran diversidad estructural de estos compuestos. Los compuestos flavonoides se subdividen en: Isoflavonas, neoflavonoides, chalconas flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, proantocianidinas y antocianidinas (Cartaya and Reynaldo, 2001).

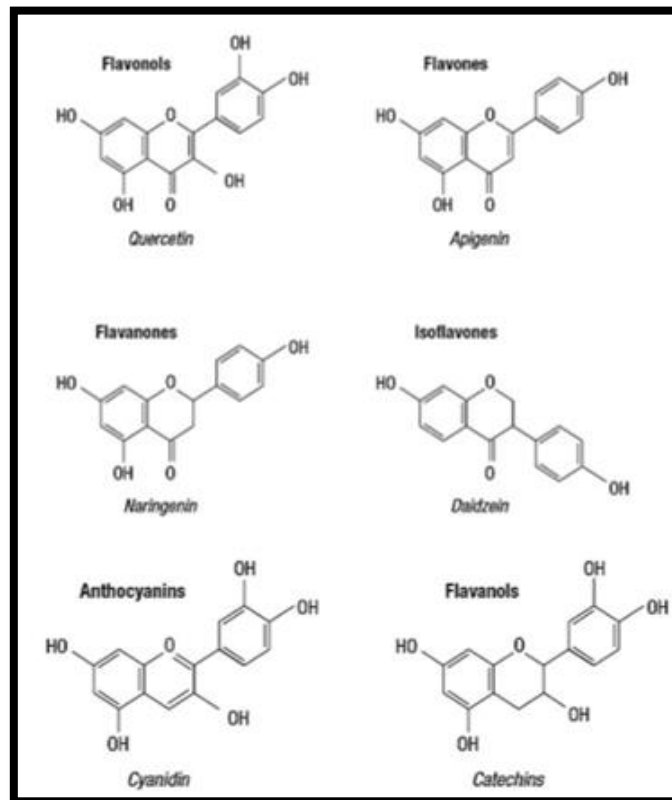


Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides. Fuente. Ignat et al., 2011.

1.5.1.2 Actividad biológica

Se ha evidenciado que los flavonoides poseen propiedades biológicas entre ellas están: antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgica, antimicrobiana, antitumorales y antitrombóticas. También actúan inhibiendo enzimas como; la lipooxigenasa, ciclooxigenas, xantina oxidasa, NADP oxidasa, mieloperoxidasa y se relacionan con la fosfolipasa A2 haciendo que se estimule la catalasa y la peróxido dismutasa, enzimas consideradas antioxidantes (Pérez Trueba, 2003).

1.5.2 Antocianinas

Son un grupo de pigmentos vegetales hidrosolubles que se encuentran acumulados en las vacuolas dentro de las células vegetales. Estos compuestos otorgan colores como rojo, azul o púrpura a las hojas, flores, frutos y cereales (Aguilera Ortíz, *et al.*, 2011). Las antocianinas en la planta básicamente cumplen dos funciones; atraer a los polinizadores para la posterior dispersión de semillas y sirven de protección a la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta (Castañeda Sánchez and Guerrero Beltrán, 2015; Garzón, 2010).

1.5.2.1 Características químicas

Las antocianidinas se encuentran en los vegetales en forma de glucósidos conocidos como antocianinas, debido a su baja solubilidad en agua. Las antocianinas están constituidas por la aglicona (molécula de antocianidina) y a ésta se une un azúcar mediante un enlace β -glucosídico como se observa en la figura 3. Estos compuestos son moléculas polares y por ello se solubilizan con más facilidad en solventes polares que en no polares (Aguilera Ortíz *et al.*, 2011).

La estructura química básica de esta aglicona es el ión flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio constituido por dos anillos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B) como se observa en la figura 3. El ion flavilio presenta sensibilidad a los cambios de pH debido a que tiene una baja cantidad de electrones. La glucosa y la ramnosa son los carbohidratos que se encuentran con mayor frecuencia seguidos de la xilosa, galactosa y arabinosa. La presencia del azúcar en la molécula le otorga solubilidad y estabilidad a la misma. (Aguilera Ortíz *et al.*, 2011).

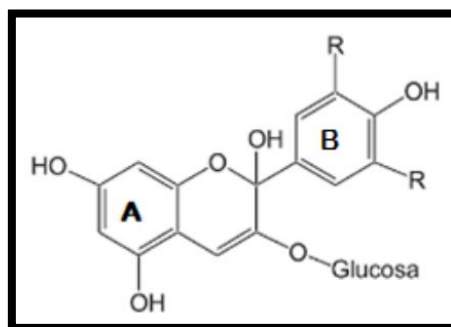


Figura 3. Estructura química de las antocianinas. Fuente. Garzón, 2008.

1.5.2.2 Clasificación

En base al número de azúcares presentes en la estructura de la antocianina, éstas se clasifican en: monoglucósidos, diglucósidos y triglucósidos, correspondiente a uno, dos o tres azúcares respectivamente. Así mismo, los azúcares presentes pueden ser monosacáridos, disacáridos o trisacáridos. Los monosacáridos más comunes son: arabinosa, xilosa, D- glucosa, ramnosa; los disacáridos más frecuentes son: gentobiosa, rutinosa y los trisacáridos pueden ser lineales como la gentotriosa o ramificados como la xilosilrutinosa (Castañeda Sánchez and Guerrero Beltrán, 2015).

En algunos casos, los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p-cumárico, caféico, ferúlico o sináptico), la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianina le proporciona estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura (Castañeda Sánchez and Guerrero Beltrán, 2015).

Se han reportado más de 635 antocianinas existentes en los vegetales, pero las más conocidas son: pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, malvidina; mismas que resultan de variaciones estructurales del anillo B, como se observa en la figura 4, y se mencionan los sustituyentes correspondientes en la tabla 2. Las tres primeras son más frecuentes en frutos mientras de las otras tres lo son en flores. La pelargonidina tiene dos sustituyentes hidrógeno y es responsable del desarrollo del color rojo. La más común, la cianidina tiene un sustituyente hidroxilo y un hidrógeno, dando lugar a una tonalidad magenta. La delphinidina tiene dos sustituyentes hidroxilo y es responsable del color azul. Existen tres metil éteres; la peonidina que se deriva de la cianidina, y la petunidina y malvidina, derivadas de la delphinidina (Castañeda Sánchez and Guerrero Beltrán, 2015; Garzón, 2008).

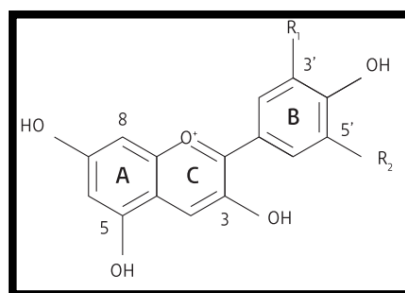


Figura 4. Estructura de las antocianidinas indicando la posición de los sustituyentes en el anillo B. Fuente. Castañeda Sánchez and Guerrero Beltrán, 2015.



Tabla 2. Antocianidinas más comunes

<i>Antocianidinas</i>	<i>R₁</i>	<i>R₂</i>
<i>Cianidina</i>	OH	H
<i>Delfinidina</i>	OH	OH
<i>Pelargonidina</i>	H	H
<i>Petunidina</i>	OMe	OH
<i>Peonidina</i>	OMe	H

Fuente. Castañeda Sánchez and Guerrero Beltrán, 2015.

El color de las antocianinas depende de factores intrínsecos dentro de los cuales están; los sustituyentes químicos presentes, así como su posición en el grupo flavilio. Por ejemplo, si aumenta el número de hidroxilos del anillo (B) se intensifica el color azul, mientras que al introducir metoxilos se origina la formación de coloración roja (Aguilera Ortíz et al., 2011; Garzón, 2008).

1.5.2.3 Actividad biológica

Estudios realizados por Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) demostraron que frutos que presentan un alto contenido de antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y contra radicales peróxidos (ROO.), superóxido (O₂⁻), hidroxilo (OH[·]) y oxígeno singulete (O₂[·]). (Wang and Jiao, 2000; Wang and Lin, 2000).

Las antocianinas presentan efectos terapéuticos como: reducción de la enfermedad coronaria efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; dichos efectos terapéuticos están directamente relacionados con la actividad antioxidante de estos compuestos. También se conoce que las antocianinas pueden actuar como agentes antimicrobianos (Miyazawa, et al., 1999).

Entre otros grupos polifenólicos de importancia tenemos: **Taninos**. Es el tercer grupo importante de los compuestos fenólicos, se dividen en taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables que son derivadas del ácido gálico. Los taninos son útiles en los sistemas biológicos debido a que son quelantes de iones metálicos. **Estilbenos**. Es un grupo de polifenoles naturales presentes en familias de plantas superiores, donde se incluyen también a los derivados hidroxilo y metoxi del estilbeno simple, así como sus formas heterósido (glicósido) y polímeros. Se encuentran en forma cis y trans, son producidas por la planta en respuesta a infección por patógenos o



condiciones de estrés. **Lignanós**. Son fitoestrógenos de los vegetales, juegan un papel importante en el crecimiento de las plantas y actúan como antioxidantes en el metabolismo humano, este compuesto en forma sintética es utilizado para quimioterapia contra el cáncer (Ignat et al., 2011).

1.6 Familia *Ericaceae*

La familia *Ericaceae* se encuentra en zonas templadas, subtempladas y bosques tropicales. Esta familia es muy diversa ya que cuenta con aproximadamente 900 especies y se distribuye en el Neotrópico; desde Costa Rica, Nicaragua, Panamá, Venezuela y parte norte de Perú; aunque la mayor concentración de especies de *Ericaceae* están localizada en Colombia y Ecuador (León- Yáñez, et al., 2011).

En Ecuador esta familia se encuentra localizada en los Andes y bosques de niebla a unos 1.000-3.000 metros de altitud, pero también se desarrollan en bosques nublados bajos y páramos. Se ha evidenciado que en nuestro país existen 22 géneros y 221 especies, esta familia presenta un alto grado de endemismo en el Ecuador, pues 98 especies son endémicas del país (León- Yáñez, et al., 2011; Rivas Carrión, 2009).

La familia *Ericaceae* es muy importante para los ecosistemas andinos, algunas especies de ericáceas son ornamentales y comestibles como es el caso de *Vaccinium floribundum*, conocido con el nombre de “mortiño”; empleado en la elaboración de la colada morada (León- Yáñez, et al., 2011).

1.7 *Macleania rupestris* Kunth

Macleania rupestris Kunth se encuentra distribuida en Nicaragua, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú en altitudes de 1.500 a 4.100 m.s.n.m (Lagos-Burbano, et al., 2010; Luteyn, 2002). Esta especie está localizada en la Sierra Ecuatoriana, específicamente en las provincias de Cañar y Azuay, en donde es conocida bajo los nombres de; joyapa, joyapa chaucha, uva camarona (De la Torre, et al., 2008). Se desarrolla en bosques, matorrales y páramos, en suelos con pH ácido, sobre afloramientos rocosos y también superficiales (Durán-Casas, et al., 2013; Lagos-Burbano, et al., 2010). La descripción taxonómica se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción taxonómica de *Macleania rupestris*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	<i>Macleania</i>
Especie	<i>Rupestris</i>

Fuente. Jorgensen, P.M.; León, 1999.

1.7.1 Características morfológicas

Macleania rupestris es un arbusto perenne de 0,6 a 2,5 metros de altura, presenta flores con sépalos cortos y tubulares de color rojizo. Las hojas son coriáceas, planas de 3 a 11 mm de largo; sus frutos son bayas globosas, carnosas y dulces de 10 a 12 mm de diámetro el color va variar desde rosado claro hasta morado al igual que su pulpa cuando han alcanzado su madurez, (figura 5) en donde las bayas presentan hasta 12.2 °Brix. Mediante el análisis bromatológico del fruto también se ha determinado que presenta una acidez titulable baja y un alto contenido de sólidos solubles (Durán-Casas, et al., 2013; Lagos-Burbano, et al., 2010).

Los frutos de *Macleania rupestris* contiene 80 mg de taninos que están presentes en la pared celular y vacuolas, la mayor concentración de los mismos se encuentra en las capas subyacentes a los lóculos (Durán-Casas, et al., 2013). Sin embargo, en ciertas especies las antocianinas se encuentran en regiones ocultas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos. Los frutos también contienen ácido benzoico, vitamina C, niacina y riboflavina, debido a la presencia de estos compuestos la joyapa presenta efectos beneficiosos para la salud (Ch. de Valencia and M. de Carrillo, 1991; Corzo Barragán, 2014).



Figura 5. Arbusto de Macleania rupestris Kunth. Fuente. Autoras.

1.7.2 Usos de *Macleania rupestris*

El fruto es comestible y se utiliza para elaboración de; jugos, mermeladas y vinos. El agua obtenida de la decocción de las hojas y frutos se lo emplea como astringente (cicatrizante) y antirreumática (afección en las articulaciones, huesos y riñones) (Lagos-Burbano, et al., 2010).

1.8 Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopía de absorción infrarroja (IR) es una técnica utilizada para la identificación de grupos funcionales en compuestos, se lo considera un análisis cualitativo y cuantitativo inmediato. Este método se encarga del estudio de la emisión o absorción de energía radiada que se origina por la interacción entre el compuesto en estudio y la radiación electromagnética (Pique, 2012).

La región de infrarrojo se extiende desde 12800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , dividido en tres regiones: IR cercano, medio o fundamental y lejano. La región del infrarrojo medio es la más empleada para el análisis de compuestos orgánicos. Esta región se subdivide en dos regiones conocidas como; región de huellas dactilares (1300 a 670 cm^{-1}) y la región de los grupos funcionales (4000 a 1300 cm^{-1}) (Skoog, et al., 2003). Las señales de absorción registradas en la zona de grupos funcionales se generan por deformación o tensión de los enlaces asociados a grupos funcionales. La zona de huellas dactilares muestra patrones de señales únicos, los cuales constituyen evidencia de la identificación de un compuesto, si se compara con un espectro de referencia. Muchos enlaces simples generan bandas de absorción a estas frecuencias (Rouessac and Rouessac, 2003; Skoog et al., 2003).



En una molécula, los átomos constituyentes no se encuentran en estado de reposo, sino que vibran dependiendo de los enlaces existentes, así cuando los átomos se encuentran muy cercanos aumenta la fuerza de repulsión y disminuye la fuerza de atracción.

Los enlaces existentes entre los átomos emiten posibles vibraciones como: tensión simétrica y asimétrica, flexión que puede ser balanceo, aleteo, tijereteo o torsión. Estas vibraciones son traducidas como señales originando un espectro infrarrojo. Para que estas señales se registren las moléculas son sometidas a un cambio en su momento dipolar (Rouessac and Rouessac, 2003).

1.8.1 Identificación de grupos funcionales por Espectroscopía Infrarroja

El análisis cualitativo de muestras desconocidas constituye una tarea fundamental en la química analítica. Para elucidar la estructura de moléculas orgánicas existen varias técnicas que proveen diferentes niveles de información. La Espectroscopía Infrarroja indica la presencia de grupos funcionales, en base a las vibraciones de enlaces moleculares. El análisis cualitativo se lleva a cabo identificando las longitudes de onda de las bandas de absorción en el espectro de la muestra con los números de onda de grupos funcionales, generalmente organizados en tablas. Ya que el espectro infrarrojo de cada compuesto es único, es posible compararlo con espectros de referencia, a fin de identificar compuestos en una muestra. Para el efecto los equipos modernos cuentan con librerías espectrales y software de búsqueda, que permite la identificación de compuestos conocidos (Bruno, 2005). Es importante tener información lo más detallada de la muestra antes de tratar de interpretar un espectro Infrarrojo con el fin de que podamos identificar los grupos funcionales de las moléculas presentes en las muestras a analizar. Los espectros que se obtengan van a depender de las vibraciones que presente las diferentes partes de una molécula pues las mismas estarán relacionadas con el peso de los átomos y de las fuerzas de enlace. La interpretación de un espectro Infrarrojo requiere tablas correlacionadas y conocimientos de Química Orgánica (Bruno, 2005).



II. METODOLOGÍA

2.1 Obtención de las muestras

Las muestras de la especie en estudio, *Macleania rupestris* Kunth fueron proporcionadas por el Grupo de Biotecnología y Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Se utilizaron extractos y fracciones de extractos orgánicos de frutos maduros de *M. rupestris*. Los extractos se obtuvieron a partir de frutos liofilizados y triturados, empleándose como solvente metanol al 99.8% de pureza. Los métodos de extracción empleados fueron Soxhlet y maceración. Para el método Soxhlet se empleó 46,92 g de material vegetal con 300 mL de solvente y para el método de maceración 100 g de muestra en 300 ml de solvente.

Para el fraccionamiento de los extractos se utilizó dos estrategias; fraccionamiento bajo presión y columna abierta por gravedad. En la columna bajo presión se utilizaron 23,07 g y 35,20 g de extracto obtenidos por Soxhlet y maceración respectivamente, obteniéndose un total de 12 fracciones. Por su parte, en la columna abierta por gravedad se colocaron 4,07 g de extracto obtenido por maceración, resultando un total de 10 fracciones. Las fracciones obtenidas fueron concentradas *in vacuo* mediante un rotavapor (Cordero, 2018). La codificación de los extractos y fracciones se presenta en el Anexo 1.

2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

Para estimar la concentración de compuestos fenólicos en los extractos y fracciones de frutos de *M. rupestris* se emplearon diversos ensayos “in vitro”. Estos métodos se fundamentan en mediciones de absorción de formas coloreadas que pueden relacionarse con la concentración de fenoles totales, flavonoides y antocianinas. A continuación, se detallan las técnicas empleadas para este fin.

2.2.1 Determinación cuantitativa de Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann (2010), con algunas modificaciones. Este método se basa en la oxidación del conjunto de compuestos polifenólicos en la muestra por el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando como resultado una coloración que es medida a una longitud de onda de 765 nm y siendo directamente proporcional al



contenido de polifenoles presentes en dicha muestra. Para la determinación de fenoles totales se construyó una curva de calibración, empleándose ácido gálico (AG) como patrón estándar.

2.2.1.1 Preparación de diluciones de muestras. Partiendo de los extractos orgánicos y fracciones de los extractos del fruto disponibles se prepararon diluciones alcohólicas, en donde se pesó alrededor de 500 mg de extracto o fracción de extracto con la adición de 1 mL de metanol. Estas diluciones se usaron para la cuantificación de fenoles totales y de flavonoides.

2.2.1.2 Elaboración de la curva de calibración. A partir de una solución madre de 1 mg/mL de ácido gálico, se prepararon cinco soluciones estándar de concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 250 $\mu\text{g/mL}$.

Se tomaron 100 μL de cada solución estándar con 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y para neutralizar la reacción se adicionaron 375 μL de Carbonato de Sodio al 20% (p/v), se homogeneizó bien y se dejó en reposo en la oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se midió en el lector de micro placas (BioTek® Epoch, EE.U.U.) a una longitud de onda de 765 nm.

2.2.1.3 Análisis de las muestras. Se tomaron 100 μL de cada extracto y fracción de extracto y se continuó con el procedimiento descrito en 2.2.1.2.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como μg de ácido gálico/mg de extracto o fracción de extracto según el caso.

2.2.2 Determinación del contenido de Flavonoides Totales

La determinación de flavonoides se realizó según el método desarrollado por (Chang, et al., 2002; Luna et al., 2013), mediante un método colorimétrico empleándose Cloruro de Aluminio hexa-hidratado como formador de complejos. Para esta determinación también se construyó una curva de calibración empleándose Quercetina como patrón estándar.



2.2.2.1 Elaboración de la Curva de Calibración. Se disolvió un miligramo de Quercetina en un volumen de etanol al 95%, y se prepararon cinco soluciones estándar de concentraciones de 0, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Se tomaron 250 μL de cada solución estándar con 750 μL de metanol al 95%, 50 μL de Cloruro de Aluminio al 10%, 50 μL de acetato de potasio 1 M y 1400 μL de agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y la absorbancia se midió en el espectrofotómetro a una longitud de 415nm. Para la medición del blanco, se reemplazó la cantidad de Cloruro de Aluminio por agua destilada.

2.2.2.2 Análisis de las muestras. Para determinar los flavonoides en las muestras (diluciones preparadas en 2.2.1.1) se siguió el mismo procedimiento descrito en 2.2.2.1 cómo se trabajó con las soluciones estándar.

Los resultados obtenidos se expresaron como μg de Quercetina/mg de extracto o fracción de extracto según el caso.

2.2.3 Determinación del contenido de antocianinas

La determinación de antocianinas se realizó mediante el método del pH diferencial descrito por Giusti & Wrolstad (2001). El principio del se basa en que los pigmentos de antocianinas monoméricas experimentan una transformación estructural reversible en función del pH (forma de oxonio coloreado a pH 1 y forma hemiacetal incolora a pH 4.5). Y la diferencia en la absorbancia a la longitud de onda máxima de 520 nm del pigmento es proporcional a su concentración. Los pigmentos de antocianinas degradadas en la forma polimérica son resistentes al cambio de color independiente del pH, por lo que no se incluyen en las mediciones, ya que éstos absorben a pH 4.5 así como a pH 1.

2.2.3.1 Preparación de soluciones buffer

- *Buffer pH 1.* Se preparó una solución de cloruro de potasio 0,025 M, pesándose 1,86 g de cloruro de potasio tras dilución con 980 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 1 con 3 mL de ácido clorhídrico 0,2 N y se completó el volumen a 1 Litro con agua destilada.



- *Buffer pH 4,5.* Se preparó una solución de acetato de sodio 0,4 M, pesándose 54,43 g de acetato de sodio tri-hidratado, tras dilución con 960 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 4,5 con 20 mL de ácido clorhídrico 1 N y se adicionó agua destilada hasta completar el volumen de 1 Litro.

2.2.3.2 Preparación de diluciones de muestras. Partiendo de los extractos orgánicos y fracciones de los extractos del fruto disponibles se prepararon diluciones alcohólicas, en donde se pesaron alrededor de 500 mg de extracto o fracción de extracto con la adición de 1 mL de metanol.

2.2.3.3 Análisis de las muestras. Se determinó primeramente el factor de dilución apropiado para cada muestra. Se diluyó la muestra con un tampón pH 1 hasta que la absorbancia de la muestra a 520 nm se encuentre entre 0,2-1,4 unidades de absorbancia. Con el factor de dilución se preparó dos diluciones de la muestra, una con un tampón de pH 1 y la otra con un tampón de pH 4,5.

Las absorbancias de cada dilución (con tampón de pH 1 y pH 4,5) fueron medidas a 520 y 700 nm, como blanco se empleó agua destilada. La lectura se realizó dentro de los 40 minutos de haber sido preparadas las diluciones.

2.2.3.4 Cálculos. La concentración de antocianinas se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pigmento de antocianina (equivalentes en mg de cianidin - 3 - glucósido/L)} \\ = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

Donde A= $(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1}} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4,5}}$; PM= peso molecular: 449,2 g/mol de cianidin-3 glucósido; FD= factor de dilución, determinado en 2.2.1.3; ϵ = 26900 coeficiente de extinción molar para cianidin-3-glucósido en $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; l = longitud de la cubeta en cm y 10^3 = factor de conversión de g a mg.

Los resultados obtenidos se expresaron como μg de cianidin-3-glucósido /mL de extracto o fracción de extracto según el caso.



2.2.4 Identificación de componentes mayoritarios por Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

Para la determinación de los grupos funcionales de las fracciones de la especie en estudio se tomaron 2 mg de fracciones de extractos, los cuales fueron colocados en el espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolet iS5, con accesorio para muestras ATR (Attenuate Total Reflectance) para su respectivo análisis.

Los resultados fueron recolectados y analizados mediante el software OMNIC®, el mismo que registró un espectro en la región del infrarrojo medio ($670 - 4000 \text{ cm}^{-1}$).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Cuantificación de antioxidantes en *Macleania rupestris*

3.1 Determinación de Fenoles Totales

En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados de determinación de la cuantificación de fenoles totales en extractos y fracciones de extractos del fruto en estudio, realizado según lo descrito en 2.2.1. Los resultados fueron calculados a partir de la curva de calibración (Anexo 7).

Tabla 4. Concentraciones de fenoles totales en extractos de *M. rupestris*

<i>Extracto total</i>	<i>Concentración ($\mu\text{g de AG/mg de extracto}$) *</i>
<i>Método Soxhlet</i>	30,62 \pm 0,193
<i>Método Maceración</i>	23,16 \pm 0,714

**: Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar*

Fuente. Autoras.

Mediante los valores expuestos en la tabla anterior se determina que, el extracto total obtenido por Soxhlet es el que recupera mayor cantidad de fenoles totales en comparación con el método de Maceración.

La cantidad de fenoles totales recuperada en el extracto obtenido por maceración supera excesivamente al expuesto en el estudio de Plazas en el año 2015, en donde determina la concentración de fenoles totales en el fruto inmaduro de *M. rupestris*, reportándose una concentración de 0,0689 $\mu\text{g de AG/mg de extracto}$ obtenido por maceración. La alta concentración obtenida en nuestro estudio puede estar relacionado con el estado de maduración de la fruta, ya que la concentración de compuestos fenólicos aumenta con el estado de maduración de la fruta (Robles S. et al., 2009).

Tabla 5. Concentraciones de fenoles totales en fracciones de extractos de *M. rupestris*

Origen de Fracción	Polaridad Fracción	Concentración (μg de AG/mg de fracción de extracto)*
<i>Extracción maceración, Columna por gravedad, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 100%	21,97 \pm 0,833
	Cloroformo 80% Metanol 20%	N.D
	Cloroformo 70% Metanol 30%	27,54 \pm 0,532
	Cloroformo 60% Metanol 40%	28,49 \pm 0,474
	Cloroformo 40% Metanol 60%	21,43 \pm 0,017
	Cloroformo 20% Metanol 80%	N.D
	Metanol 100%	22,96 \pm 0,727
	Cloroformo 100%	N.D
	Cloroformo 80% Metanol 20%	N.D
	Cloroformo 60% Metanol 40%	26,94 \pm 0,131
<i>Extracción maceración, Columna bajo presión, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 40% Metanol 60%	29,90 \pm 0,298
	Cloroformo 20% Metanol 80%	24,69 \pm 0,013
	Metanol 100%	25,72 \pm 0,024
	Cloroformo 100%	N.D
	Cloroformo 80% Metanol 20%	21,47 \pm 0,151
	Cloroformo 60% Metanol 40%	N.D
	Cloroformo 40% Metanol 60%	30,15 \pm 0,098
<i>Extracción Soxhlet, Columna bajo presión, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 20% Metanol 80%	26,94 \pm 0,005
	Metanol 100%	27,49 \pm 0,222

N.D: No disponible, insuficiente cantidad de muestra

*: Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar

Fuente. Autoras.

Las fracciones que exhiben la mayor cantidad de fenoles totales son las fracciones Cloroformo 60%-Metanol 40% (maceración, columna a gravedad) y Cloroformo 40%-Metanol 60% (Soxhlet y maceración columna bajo presión), presentándose concentraciones de 28,49 \pm 0,474; 29,90 \pm 0,298 y 30,15 \pm 0,098 μg de AG/mg de fracciones de extractos respectivamente. Por lo que se determina que en las fracciones de mediana polaridad tanto de maceración como de Soxhlet bajo presión se recupera la mayor cantidad de fenoles totales.



Los valores obtenidos para fenoles totales de las fracciones de mediana polaridad difieren con el estudio de Cordero, 2018, en el cual se demuestra que las fracciones más polares presentan mayor actividad antioxidante.

Debido a que el fruto de *M. rupestris* tiene pocos estudios se comparó con otros frutos de la familia *Ericaceae*. Los valores expuestos en este estudio son inferiores al estudio realizado en *Vaccinium floribundum* (mortiño), en donde se determinó el contenido de fenoles totales con un valor de 1,64 μg de AG/mg de fibra de fruto (Guerrero, 2012).

El contenido de fenoles totales se relaciona con la actividad antioxidante, permitiendo contrarrestar los radicales libres causantes del estrés oxidativo responsables de varias alteraciones a nivel del organismo. (Avella, M., García, A. and Mendoza, 2008).

3.2 Determinación de Flavonoides Totales

En las tablas 6 y 7 se presentan los resultados de determinación de la cuantificación de flavonoides totales en extractos y fracciones de extractos del fruto en estudio, realizado según lo descrito en 2.2.2. Los resultados fueron calculados a partir de la curva de calibración (Anexo 8).

Tabla 6. Concentraciones de flavonoides totales en extractos de *M. rupestris*

<i>Extracto total</i>	<i>Concentración (μg de Quercetina/mg de extracto)*</i>
<i>Método Soxhlet</i>	1,07 \pm 0,006
<i>Método Maceración</i>	0,66 \pm 0,002

**: Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar*

Fuente. Autoras.

Mediante los valores expuestos en la tabla anterior se determina que, el extracto total obtenido por Soxhlet es el que recupera mayor cantidad de flavonoides en comparación con el método de maceración.

La cantidad recuperada de flavonoides en el extracto obtenido por maceración es superior al reportado por Plazas en el 2015. Estudio en donde, Plazas analiza extractos de frutos inmaduros de seis especies de ericáceas colombianas incluyendo *M. rupestris*, reportando una concentración de 0,0237 μg de quercetina/mg de extracto metanólico para



esta especie y para *Gaultheria erecta* un valor de 0,0907 µg de quercetina/mg de extracto (especie con mayor concentración).

Son pocos los estudios realizados en *M. rupestris* por lo que se hace una comparación con estudios existentes de la misma familia. Palacios en el 2017, reporta 0,0025 µg de quercetina/mg de extracto seco en *Arbutus unedo* (madroño), valor que es inferior a los reportados en este estudio. La variabilidad de la cantidad de metabolito puede deberse a varios factores como se mencionaron anteriormente.

Tabla 7. Concentraciones de flavonoides en fracciones de extractos de *M. rupestris*

<i>Origen de Fracción</i>	<i>Polaridad Fracción</i>	<i>Concentración (µg de Quercetina/mg de fracción de extracto)*</i>
<i>Extracción maceración, Columna por gravedad, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 100%	0,037 ± 0,002
	Cloroformo 80% Metanol 20%	N.D
	Cloroformo 70% Metanol 30%	2,01 ± 0,003
	Cloroformo 60% Metanol 40%	1,05 ± 0,006
	Cloroformo 40% Metanol 60%	0,36 ± 0,003
	Cloroformo 20% Metanol 80%	N.D
	Metanol 100%	2,58 ± 0,011
	<i>Extracción maceración, Columna bajo presión, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 100%
Cloroformo 80% Metanol 20%		N.D
Cloroformo 60% Metanol 40%		0,85 ± 0,027
Cloroformo 40% Metanol 60%		3,21 ± 0,081
Cloroformo 20% Metanol 80%		0,47 ± 0,004
Metanol 100%		2,06 ± 0,003
<i>Extracción Soxhlet, Columna bajo presión, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>		Cloroformo 100%
	Cloroformo 80% Metanol 20%	1,69 ± 0,002
	Cloroformo 60% Metanol 40%	N.D
	Cloroformo 40% Metanol 60%	3,21 ± 0,080
	Cloroformo 20% Metanol 80%	1,75 ± 0,002
	Metanol 100%	1,77 ± 0,005

N.D: No disponible, insuficiente cantidad de muestra

**: Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar*

Fuente. Autoras.



Las fracciones que exhiben la mayor cantidad de flavonoides totales son las fracciones: Metanol 100% en las columnas por gravedad con $2,58 \pm 0,011\mu\text{g}$ de quercetina/ mg de fracción de extracto, y Cloroformo 40%- Metanol 60% en las columnas bajo presión (Soxhlet y maceración) con $3,21 \pm 0,081 \mu\text{g}$ de quercetina/ mg de fracción de extracto en ambos casos. Por lo que se determina que en las fracciones de mediana polaridad tanto de maceración como de Soxhlet bajo presión se recupera la mayor cantidad de flavonoides totales.

Como se evidencia las mayores concentraciones se encuentran en fracciones de mediana polaridad, recuperándose $3,21 \pm 0,081 \mu\text{g}$ de quercetina/ mg de fracción de extracto para el caso de las columnas bajo presión y en las fracciones por gravedad la mayor concentración está en la fracción con mayor polaridad (Metanol 100%) recuperándose $2,58 \pm 0,011 \mu\text{g}$ de quercetina/ mg de fracción de extracto. Al obtener cantidades mayores en fracciones de extractos comparadas con los extractos totales, se comprueba la utilidad del fraccionamiento del extracto previo al análisis de un metabolito de interés. Pues esta metodología asegura la separación según la polaridad de los compuestos existentes en el extracto mediante el solvente empleado para la extracción.

Los valores obtenidos para flavonoides son inferiores en comparación con los obtenidos para fenoles totales, demostrándose una correlación debido a que los flavonoides se encuentran dentro del subgrupo de los fenoles totales, reportándose en menor proporción.

3.3 Determinación de Antocianinas

En las tablas 8 y 9 se presentan los resultados de determinación de la cuantificación de antocianinas en extractos y fracciones del fruto en estudio, realizado según lo descrito en 2.2.3.

Tabla 8. Concentraciones de antocianinas en extractos de *M. rupestris*

<i>Extracto total</i>	<i>Concentración (μg de cianidin-3-glucósido/mL de extracto)*</i>
<i>Método Soxhlet</i>	$0,05 \pm 0,012$
<i>Método Maceración</i>	$0,33 \pm 0,129$

**: Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar*

Fuente. Autoras.



El extracto total obtenido por maceración presenta una mayor concentración de antocianinas que el extracto de Soxhlet, con un valor de $0,33 \pm 0,129$ μg de cianidin-3-glucósido/mL de extracto.

La concentración determinada para el extracto total obtenido por maceración es superior al expuesto por Burgos, et al., en el 2016. En donde se cuantifica antocianinas totales en extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* “Arándano”, siendo $0,000030$ μg de cianidina-3-glucosido/mL la concentración más alta para el extracto a un grado etanólico de 96° GL. Al no existir un estudio similar, en donde se determine el metabolito en la fruta en estudio se hace la comparación entre dos especies pertenecientes a la misma familia (*Ericaceae*). Por su parte, al compararla con *Berberis boliviana* Lechler que es una baya con similares características a la fruta en estudio (hábitat y coloración del fruto), el valor obtenido en el presente estudio es inferior al expuesto por Del Carpio, et al., en el 2009, en donde determina una concentración de antocianinas de 70 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de fruto seco de *Berberis boliviana* Lechler. Como se mencionó, siempre existirá una variabilidad en la concentración de metabolitos en las plantas, que están relacionadas con algunos factores como es condiciones de desarrollo del vegetal, parte sometida al estudio, métodos y solventes empleados en la extracción, por mencionar algunos (Robles S. et al., 2009).

Las fracciones obtenidas por separación en columnas provienen del extracto por maceración y Soxhlet (Cordero, 2018). En la Tabla 9 se presentan las concentraciones de antocianinas para las fracciones obtenidas mediante columna por gravedad y a presión reducida.



Tabla 9. Concentraciones de antocianinas en fracciones de extractos de *M. rupestris*

<i>Origen de Fracción</i>	<i>Polaridad Fracción</i>	<i>Concentración (µg de cianidin-3-glucósido/mL de fracción de extracto) *</i>
<i>Extracción maceración, Columna por gravedad, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 100%	0,13 ± 0,071
	Cloroformo 80% Metanol 20%	0,18 ± 0,784
	Cloroformo 70% Metanol 30%	0,19 ± 0,060
	Cloroformo 60% Metanol 40%	0,39 ± 0,071
	Cloroformo 40% Metanol 60%	2,18 ± 0,131
	Cloroformo 20% Metanol 80%	4,42 ± 0,099
	Metanol 100%	0,63 ± 0,293
	Cloroformo 100%	N.D
	Cloroformo 80% Metanol 20%	N.D
<i>Extracción maceración, Columna bajo presión, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 60% Metanol 40%	0,05 ± 0,026
	Cloroformo 40% Metanol 60%	0,06 ± 0,016
	Cloroformo 20% Metanol 80%	0,10 ± 0,045
	Metanol 100%	0,20 ± 0,069
	Cloroformo 100%	N.D
	Cloroformo 80% Metanol 20%	0,03 ± 0,022
	Cloroformo 60% Metanol 40%	0,22 ± 0,088
<i>Extracción Soxhlet, Columna bajo presión, Fase estacionaria Sílica Gel, gradiente polaridad Cloroformo:Metanol</i>	Cloroformo 40% Metanol 60%	0,36 ± 0,109
	Cloroformo 20% Metanol 80%	0,42 ± 0,147
	Metanol 100%	0,71 ± 0,399

N.D: No disponible, insuficiente cantidad de muestra

**: Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar*

Fuente. Autoras.

En las columnas por gravedad encontramos que la concentración mayoritaria de antocianinas está en la fracción de alta polaridad (Cloroformo 20%-Metanol 80%) con una concentración de 4,42 µg de cianidin-3-glucósido/mL. Por su parte, en las columnas bajo presión se evidencia que mientras se eleva la polaridad, la concentración de antocianinas aumentan, recuperándose así 0,20 ± 0,069 y 0,71 ± 0,399 µg de cianidin-3-glucósido /mL de fracción de extracto tanto para el extracto de maceración y Soxhlet respectivamente a una polaridad de Metanol 100%. Por lo que se determina que las



fracciones provenientes del extracto de maceración por gravedad son las que recuperan mayor cantidad de antocianinas.

Debido a que todas las fracciones presentan antocianinas, se puede considerar a esta fruta como una fuente rica en este metabolito. Además, a simple vista la fruta en su estado maduro presenta un color característico que va de rosa a púrpura (estado de madurez) (Aguilera Ortíz et al., 2011; Durán-Casas, et al., 2013). Por su parte, esto evidencia que la coloración en el fruto de *M. rupestris* se debe a la presencia de antocianinas, sin embargo se desconoce la antocianina específica en el fruto.

La presencia de compuestos fenólicos con valores relativamente altos en los extractos y fracciones de joyapa difiere con el estudio realizado por Cordero, 2018. En el que se evidencia una mayor actividad antioxidante en las fracciones por columna bajo presión: Cloroformo 40%- Metanol 60%, Cloroformo 20%-Metanol 80% y Metanol 100%; obtenidas por Soxhlet reportándose valores de 54,72 %, 66,64 % y 68,33 % de atrapamiento del ion estable ABTS y 48,25 %, 55,06 % y 65,15 % de atrapamiento del ion estable ABTS para las fracciones obtenidas por maceración. Por su parte, en el presente estudio las fracciones que recuperan la mayor concentración de fenoles totales y flavonoides son las fracciones de polaridad media, Cloroformo 40%- Metanol 60% columnas bajo presión (Soxhlet y maceración), no así en el caso de antocianinas la recuperación de la mayor cantidad de este metabolito se da en las fracciones obtenidas mediante columnas bajo presión (Soxhlet y maceración), pero a una polaridad alta, Metanol 100%. Además, Cordero reporta la posible existencia de compuestos polares en las columnas antes mencionadas, por lo que se le atribuiría la actividad antioxidante a la fruta en estudio.

- **Comparación del contenido de compuestos fenólicos por los dos métodos de extracción**

Al comparar el contenido de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos por las dos técnicas de extracción tenemos que, en el extracto de Soxhlet se recupera la mayor cantidad de fenoles totales y flavonoides en comparación con el extracto obtenido por maceración. Y al determinar antocianinas el extracto de maceración sobresale sobre el de Soxhlet. En la ilustración 1, se muestran las concentraciones de los metabolitos

analizados, en donde se evidencia la disminución en el valor de la concentración de los metabolitos, iniciando con los fenoles totales que abarca a los dos subgrupos (flavonoides y antocianinas).

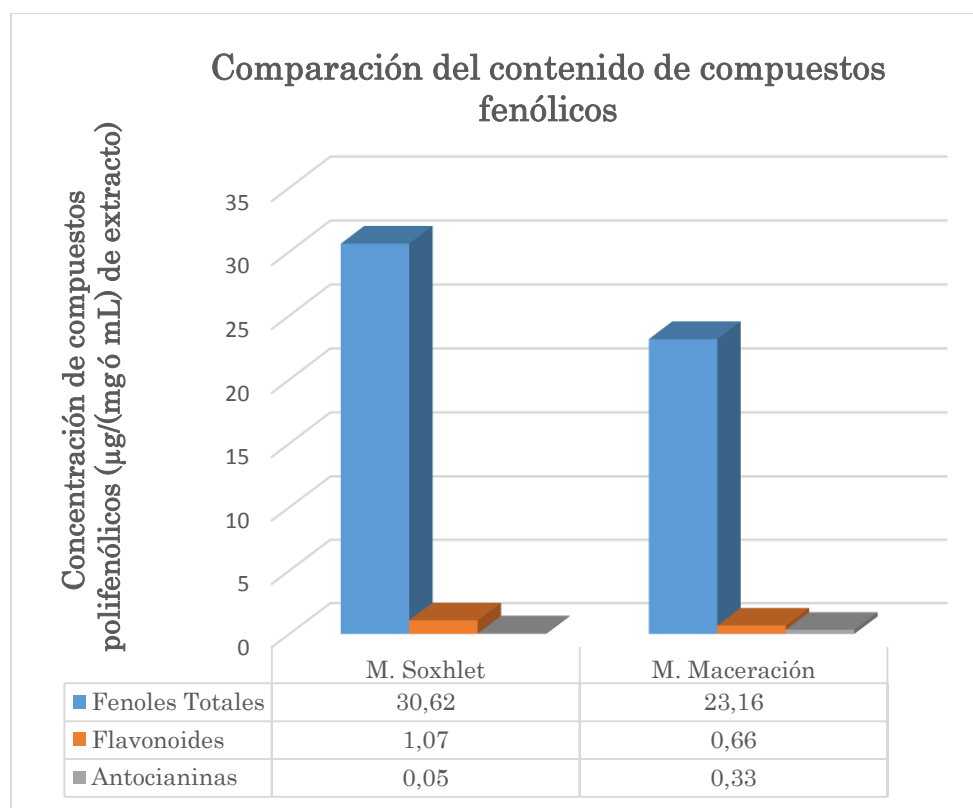


Ilustración 1. Concentraciones promedio de compuestos polifenólicos en los extractos de maceración y Soxhlet. Fuente. Autoras.

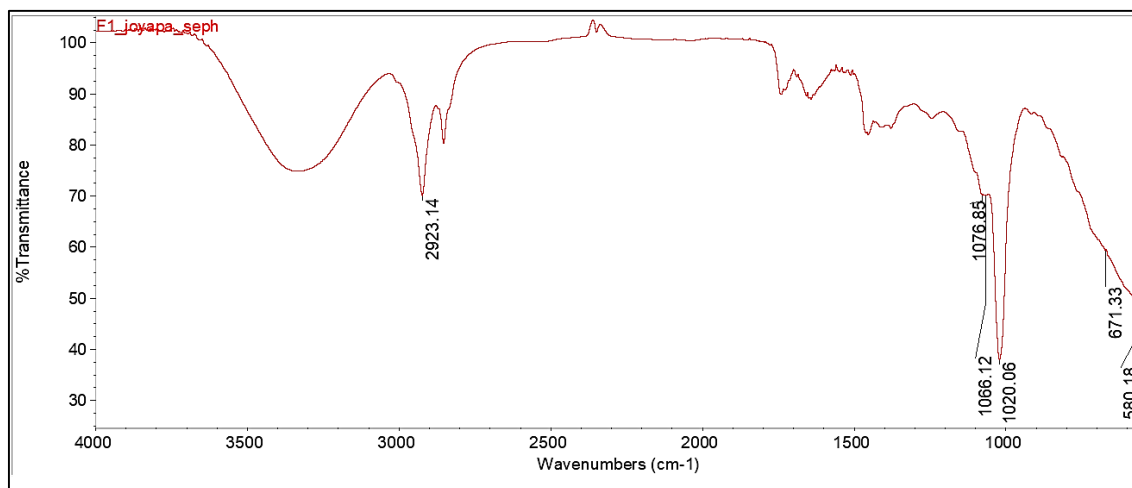
3.4 Caracterización de grupos funcionales

Con el empleo de la Espectroscopia Infrarroja es posible caracterizar grupos funcionales de compuestos (Skoog, et al., 2001). Se tomaron 3 fracciones obtenidas por el método de maceración, columna bajo presión (Cloroformo 60%- Metanol 40%, Cloroformo 20%-Metanol 80% y Metanol 100%) y 4 fracciones obtenidas por el método de Soxhlet, columna bajo presión (Cloroformo 80%- Metanol 20%, Cloroformo 40%-Metanol 60%, Cloroformo 20%-Metanol 80% y Metanol 100%), obteniéndose un total de 7 fracciones. Las fracciones fueron procesadas como se explica en el apartado 2.2.4., obteniéndose espectros infrarrojos.

En las gráficas 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 muestran los espectros de las fracciones analizadas, las tres primeras son menos polares y las 4 últimas más polares. La interpretación de

espectros se basó en comparaciones con datos de literatura provenientes del libro de Rubinson K. Rubinson, 2004. Las tablas estandarizadas empleadas en la comparación se muestran en el Anexo 7.

Las tablas 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 muestran: números de onda, tipo de vibración, enlace y el grupo funcional asignado.

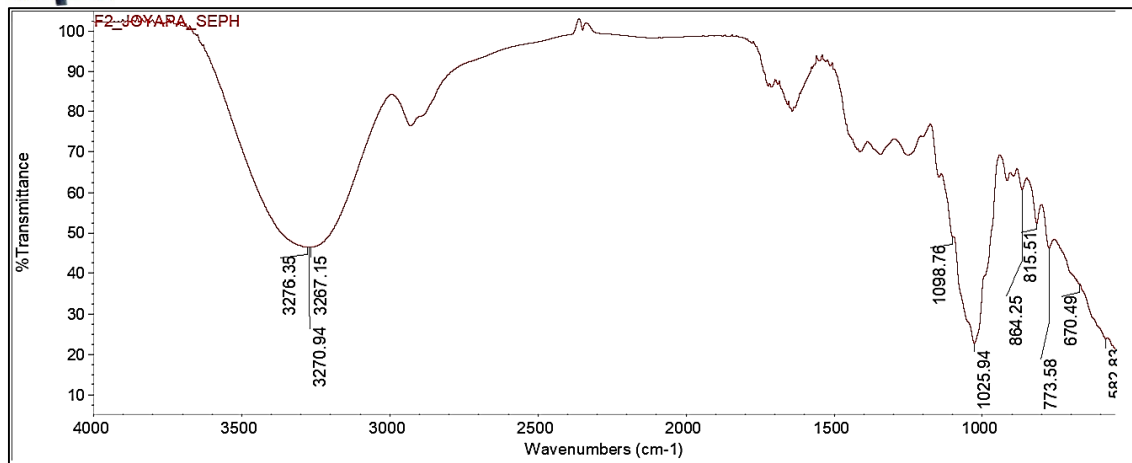


Gráfica 1. Espectro de la fracción Cloroformo 60%- Metanol 40% (Maceración, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 10. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 60%- Metanol 40%

Número de onda	Tipo de vibración	Interpretación
3350	Estiramiento OH	Alcoholes y fenoles
2923	Estiramiento C-H	Alcanos
2850	Estiramiento C-H	Alcanos
1076	Flexión =C-H	Grupos aromáticos
1066	Estiramiento C-O	Alcoholes primarios
1020	Estiramiento C-O	
671	Flexión =C-H	Grupos aromáticos
580	Bandas muy intensas, $\epsilon \approx 100$ a 500. El número, forma e intensidad relativa depende de los hidrógenos libres.	

Fuente. Autoras.

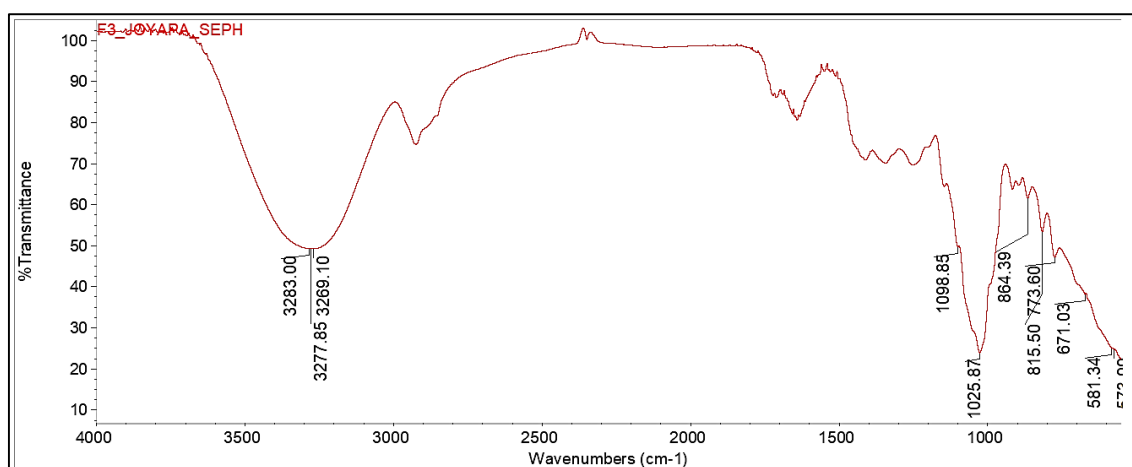


Gráfica 2. Espectro de la fracción Cloroformo 80%- Metanol 20% (Soxhlet, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 11. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 80%- Metanol 20%

Número de Onda	Tipo de vibración	Interpretación
3270	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
3000	Estiramiento C-H	Alcanos
1642	Estiramiento C=C	Alquenos
1098	Flexión =C-H	Grupos aromáticos
1025	Estiramiento C-O	Alcoholes primarios
864	Vibraciones fuera de plano C-H	Grupos aromáticos
815	Vibraciones fuera de plano C-H	Grupos aromáticos
773	Torsión de N-H	Aminas
670	Flexión =C-H	Grupos aromáticos
582	Bandas muy intensas, $\epsilon \approx 100$ a 500. El número, forma e intensidad relativa depende de los hidrógenos libres.	

Fuente. Autoras.

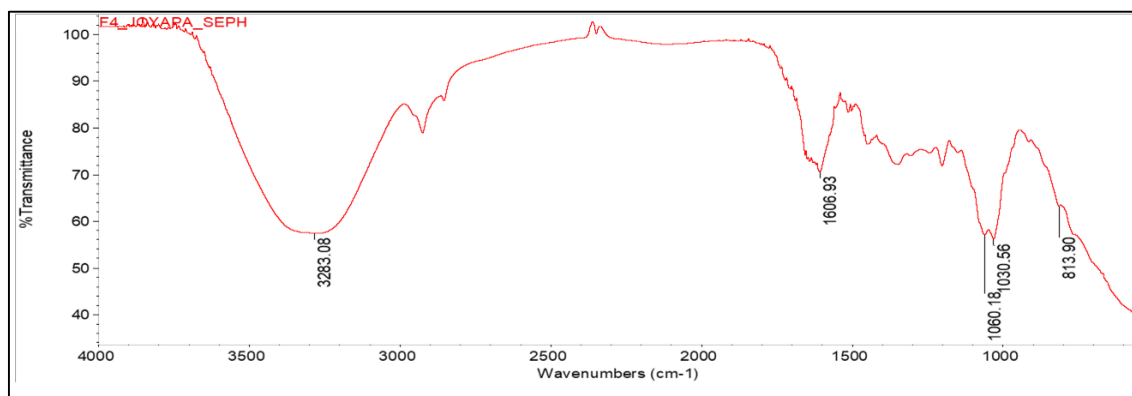


Gráfica 3. Espectro de la fracción Cloroformo 40%-Metanol 60% % (Soxhlet, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 12. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 40%-Metanol 60%

Número de Onda	Tipo de vibración	Interpretación
3277	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
3000	Estiramiento C-H	Alcanos
1550	Estiramiento C=C	Grupos aromáticos
1098	Flexión =C-H	Grupos aromáticos
1025	Estiramiento C-O	Alcoholes primarios
815	Estiramiento C=C y de flexión =C-H	Grupos aromáticos
671	Flexión =C-H / Vibraciones fuera de plano C-H	Grupos aromáticos
581	Bandas muy intensas, $\epsilon \approx 100$ a 500. El número, forma e intensidad relativa depende de los hidrógenos libres.	

Fuente. Autoras.

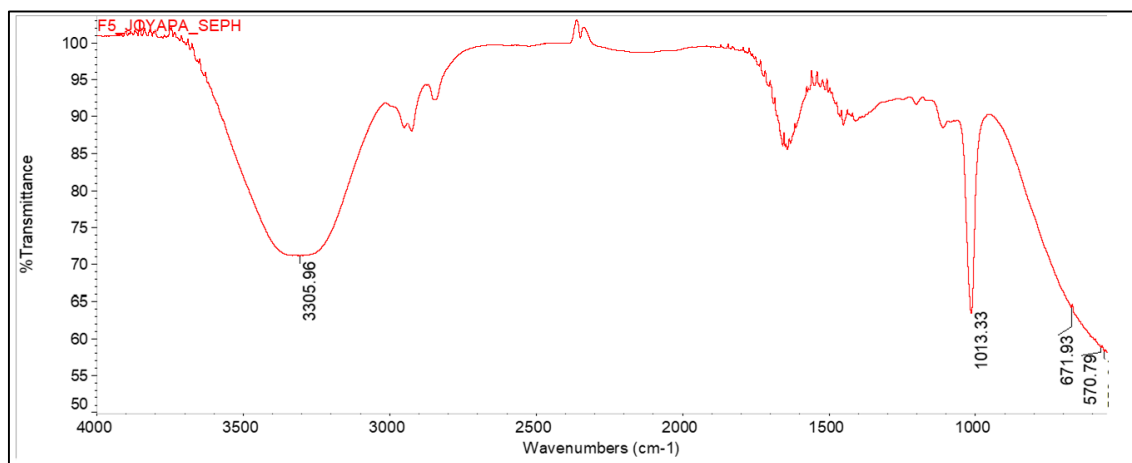


Gráfica 4. Espectro de la fracción Cloroformo 20%-Metanol 80% (Maceración, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 13. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 20%-Metanol 80%

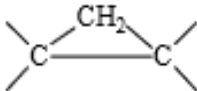
Número de Onda	Tipo de vibración	Interpretación
3283	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
2942	Estiramiento C-H	Alcanos
1606	Estiramiento C=C	Alquenos
1300	Balanceo C-H	Alcano (metilo)
1060	Ésteres	Ésteres y éteres
	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array}$	
1030	$\begin{array}{c} \text{R(H)} \\ \diagup \\ \text{R}-\text{N} \\ \diagdown \\ \text{R(H)} \end{array}$ <p>Tipo de enlace C-N</p>	Aminas
813	<p>trisustituído</p> $\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}_1 \quad \text{H} \end{array}$ <p>Estiramiento C=C y de flexión =C-H</p>	Alquenos

Fuente. Autoras.

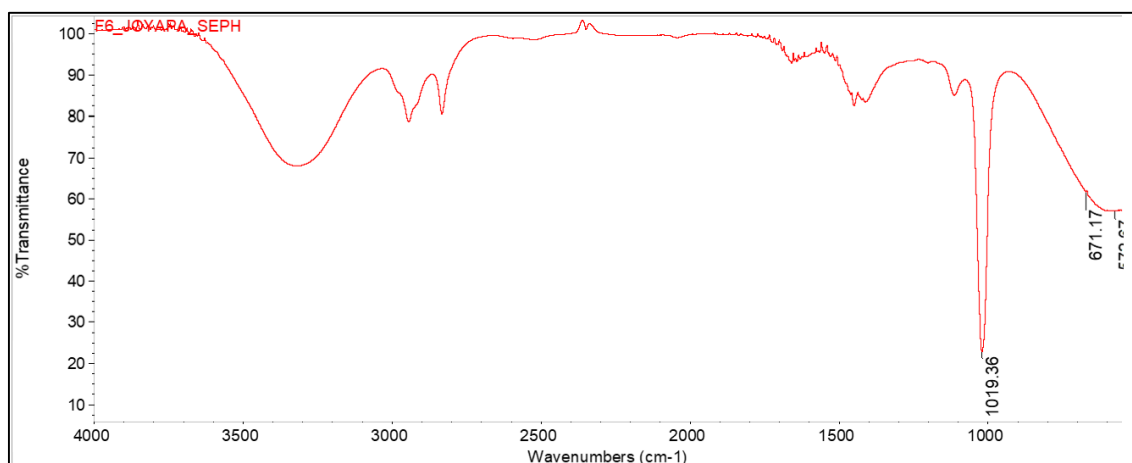


Gráfica 5. Espectro de la fracción Metanol 100% (Maceración, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 14. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Metanol 100%

Número de Onda	Tipo de vibración	Interpretación
3305	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
1814	R-CH=CH2	Vinilo terminal
1013		Alcanos
	Ausente en anillos sin -CH2-	
671	Flexión =C-H	Alquenos
570	Bandas muy intensas, $\epsilon \approx 100$ a 500. El número, forma e intensidad relativa depende de los hidrógenos libres.	

Fuente. Autoras.

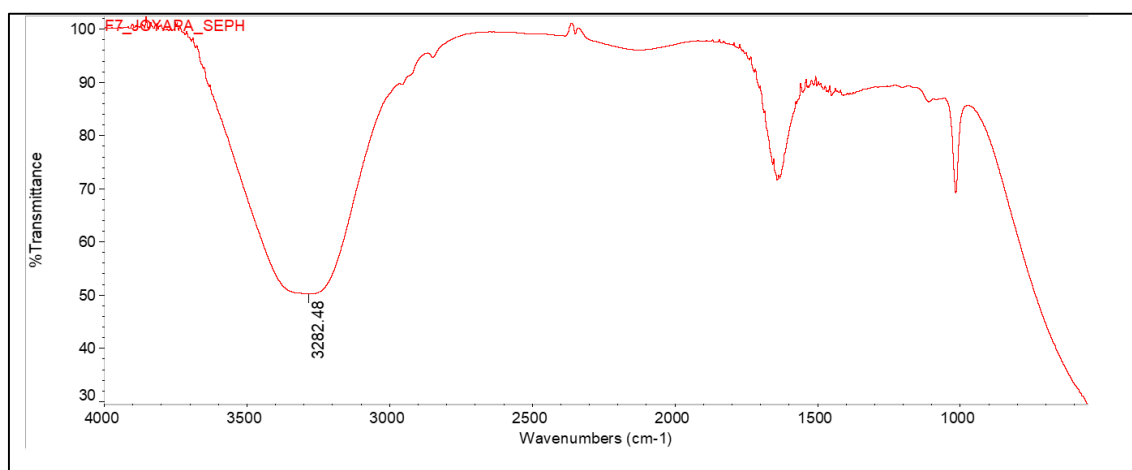


Gráfica 6. Espectro de la fracción Cloroformo 20%-Metanol 80% (Soxhlet, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 15. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Cloroformo 20%-Metanol 80%

Número de Onda	Tipo de vibración	Interpretación
3342	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
2914	Estiramiento C-H	Alcanos
2828	Estiramiento C-H	Alcanos
1657	Estiramiento C=C	Alquenos (Trieno)
1400	-CH ₂ -CO- / -CH ₂ -N+	Éster
1019	Estiramiento C-O	Alcohol primario
671	Flexión =C-H	Alquenos
570	Bandas muy intensas, ε≈100 a 500. El número, forma e intensidad relativa depende de los hidrógenos libres.	

Fuente. Autoras.



Gráfica 7. Espectro de la fracción Metanol 100% (Soxhlet, columna bajo presión) del extracto de *M. rupestris*.

Tabla 16. Grupos Funcionales del espectro de la fracción Metanol 100%

Número de Onda	Tipo de vibración	Interpretación
3282	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
1657	Estiramiento C=C	Alquenos (Trieno)
1028	Estiramiento C-O	Alcohol Primario

Fuente. Autoras.

Las gráficas anteriormente presentadas muestran los espectros de FT-IR obtenidos, en donde la primera señal aparece a números de onda que van desde 3500 a 3200 cm⁻¹. Estas señales corresponden a la vibración característica del grupo funcional OH presente en alcoholes y fenoles (Rubinson K. Rubinson, 2004). Estas vibraciones son similares a las presentadas en el estudio realizado por (López, et al., 2017) donde exudados gomosos de cinco especies de plantas son caracterizados mediante FT-IR, demostrándose la



presencia del grupo funcional OH a un número de onda entre 3584 a 3424 cm^{-1} . Con ello se confirma la existencia de los compuestos ya mencionados en las fracciones analizadas.

La presencia de enlaces C-H se evidencia a números de onda que van desde 2960 a 2921 cm^{-1} correspondientes a alcanos. Estas señales se muestran en las gráficas 1, 2, 3, 4 y 6 a números de onda que van desde 3000 a 2900 cm^{-1} (López Medina et al., 2017).

En la gráfica 5 se muestra la presencia de alcanos con una señal a 1013 cm^{-1} , pero éstos están ausentes en compuestos con anillos y la presencia de un vinilo terminal con una señal de 1814 cm^{-1} .

La presencia de alquenos se evidencia con señales características de dobles enlaces entre C=C que van de 1680 a 1600 cm^{-1} números de onda (gráficas 2, 4, 6 y 7), estas señales fueron observadas por López a 1637 cm^{-1} números de onda.

Las gráficas 2 y 3 muestran bandas con enlaces C-H a números de onda de 1100 a 690 cm^{-1} , demostrando la presencia de grupos aromáticos, en la gráfica 2 también se evidencia la presencia del grupo funcional amina (C-N) debido a la aparición de una torsión a 773 cm^{-1} números de onda; pudiendo tratarse de una amina primaria o secundaria.

La gráfica 4 y 6 muestran la presencia de grupos éster, evidenciado por la aparición de señales entre 1300 - 1000 cm^{-1} , señales similares a las demostradas en el estudio de (Tenorio Rodríguez, 2018) en donde determina compuestos fenólicos en macroalgas marinas demostrando la presencia de florotaninos por sus enlaces éter o éster aromáticos.



IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- ✚ Al caracterizar *Macleania rupestris* en su contenido de antioxidantes encontramos que, la mayor concentración de fenoles totales se encuentra en las polaridades medias, Cloroformo 40%-Metanol 60% tanto para extractos obtenidos por Soxhlet y Maceración (columna bajo presión) y a una polaridad de Cloroformo 60%-Metanol 40% para columna por gravedad, esto se debe a que el método de Folin-Ciocalteu es un método general que cuantifica todos los compuestos polifenólicos incluido taninos.
- ✚ Al discriminar la concentración de fenoles totales en flavonoides y antocianinas encontramos que la mayor cantidad de antocianinas se recupera de fracciones de una alta polaridad de Cloroformo 20% Metanol 80%, en extractos obtenidos por Maceración (gravedad) y en Metanol 100% en fracciones obtenidas por Soxhlet y maceración empleando columna bajo presión. Las fracciones más ricas en flavonoides son de polaridades medias en la separación por columna bajo presión y en polaridades altas en la separación por gravedad.
- ✚ Mediante Espectroscopía Infrarroja se determinaron los grupos funcionales que se asocian con la presencia de compuestos polifenólicos en las fracciones del fruto de joyapa. Los grupos funcionales caracterizados son: hidroxilo, éster, aminas y anillos aromáticos; presentes en la estructura de los compuestos polifenólicos analizados (fenoles totales, flavonoides y antocianinas).
- ✚ De los resultados obtenidos se considera a *Macleania rupestris* como una fuente rica de compuestos antioxidantes principalmente fenoles y flavonoides, demostrándose que el consumo de esta fruta puede generar efectos beneficiosos para la salud. La concentración de antocianinas está relacionada con la coloración característica de esta fruta.



- Las concentraciones de metabolitos en general presentes en los extractos vegetales van a depender de varios factores entre ellos: el origen y parte del vegetal estudiado, la conservación y estado de maduración del fruto, además del método de extracción y los solventes empleados.

4.2 RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones se recomienda la determinación de flavonoides y antocianinas específicas presentes en *M. rupestris* mediante el uso de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) acoplado a métodos de detección como espectrometría de masas.

También se recomienda realizar la determinación de taninos en la fruta estudiada, debido a que en revisiones bibliográficas se le otorga propiedades antisépticas y antioxidantes.



V. REFERENCIAS

- Aguilera Ortíz, M., Reza Vargas, M., Chew Madinaveita, R. G., & Meza Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las Antocianinas. *Rev. BIOTecnia*, 13(2), 16-22. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Avella, M., García, A. and Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología*, 1-5. <https://doi.org/SM2008-M220-1108-1>
- Banerjee, A. K., Mandal, A., Chanda, D., & S., C. (2003). Oxidant, Antioxidant and Physical Exercise. *Journal of Molecular and Cellular Biochemistry*, 253, 307-312. <https://doi.org/10.1023/A1026032404105>
- Berg, G. (2010). Vitamina E: Un tema siempre presente, nunca concluido. *Revista Argentina de Cardiología*, 78(5), 391-392.
- Brenes, A. (2014). Los carotenoides dietéticos en el organismo animal. *Rev. Nutrición animal tropical*, 8(1), 21-29.
- Bruno, L. (2005). Undergraduate Instrumental Analysis. En J. Robinson, E. Skelly, & G. Frame (Eds.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (sixth, Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Burgos, K. S., Ruiz, S. G., & Ganoza, M. L. (2016). Antocianinas totales y capacidad antioxidante in vitro de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* «Arándano». *Ucv-Scientia*, 8(1), 44-48. <https://doi.org/10.18050/revucv-scientia.v8n1a5>
- Carbajal Cabellos, C. E., & Lezma Julca, K. (2019). *Antioxidante no enzimático en jóvenes y adultos del Distrito El Porvenir*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Reseña bibliográfica FLAVONOIDES : Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Castañeda Sánchez, A., & Guerrero Beltrán, J. A. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. Universidad de las Américas Puebla, México.
- Castillo, E. (2019). Vitamina C En La Salud Y En La Enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 19(4), 95-100. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v19i4.2351>
- Ch. de Valencia, M. L., & M. de Carrillo, N. (1991). Anatomía del fruto de *Macleania rupestris* (H.B.K.) A.C. Smith (Uva Camarona). *Rev. Agronomía Colombiana*, 8(2), 286-305.
- Chang, C.-C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Cordero, J. (2018). Separación bioguiada de extractos orgánicos de *Macleania rupestris* (Joyapa) y evaluación desu potencial nutracéutico. Universidad de Cuenca.
- Cordero Machuca, J. G. (2018). *Separación bioguiada de extractos orgánicos de*



- Macleania rupestris* (Joyapa) y evaluación de su potencial nutracéutico (Universidad de Cuenca). <https://doi.org/10.1051/mateconf/201712107005>
- Coronado, M., Vega Y León, S., Vázquez, M. &, & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206-212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Corrales, L., & Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250. <https://doi.org/10.22490/24629448.1010>
- Correa Gordillo, J., Ortiz, D., Larrahondo, J. E., Sánchez Mejía, M., & Pachón, H. (2012). Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. *Rev. Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 11(0717-7917), 113-122.
- Corzo Barragán, D. C. (2014). Estudio del comportamiento poscosecha de *Macleania rupestris* (kunth) en diferentes tipos de envases y condiciones de temperatura. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 15(1665-0204), 77-82.
- Criado Dabrowska, C., & Moya Mir, M. S. (2009). Vitaminas y antioxidantes. *Actualizaciones-EL MÉDICO*, 5-33. Recuperado de http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf?botsearch
- De la Torre, L., H. Navarrete, P. Muriel M., M. J. M. & H. B. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* (Primera). Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Del Carpio, C., S. C., & Giusti, M. (2009). CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE *Lechler*. *Rev. Soc. Quím Perú*, 75(1), 76-86.
- Di Vaio, C., Graziani, G., Marra, L., Cascone, A., & Ritieni, A. (2008). Antioxidant capacities , carotenoids and polyphenols evaluation of fresh and refrigerated peach and nectarine cultivars from Italy. *Journal European Food Research and Technology*, (227), 1225-1231. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0840-z>
- Durán-Casas, S., Veloza-Suan C., Magnitsky , S. and Lancheros, H. (2013). Evaluation of uva camarona (*Macleania rupestris* Kunth A . C . Smith) propagation with air layering. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 18-26. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652013000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=
- Echavarría Z., B., Franco S., A., & Martínez M, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae. Revistas de la Facultad de Química Farmaceutica*, 16(1), 126-131. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a15.pdf>
- Estrada Reyes, R., Ubaldo Suárez, D., & Araujo Escalona, A. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Journal of Salud mental*, 35, 375-384.
- Ganoza, M., Cotilla, N., Velásquez, S., & Polo, M. (2015). Compuestos fenólicos



- totales y actividad antioxidante de extractos de especies vegetales de Cachicadán, La Libertad-Perú. *Revista Perspectiva*, 16(18), 203-208. Recuperado de <http://revistas.upagu.edu.pe/index.php/PE/article/view/386>
- Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal*, 13(3), 27-36.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, (1), F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>
- González Calvo, G., & García López, D. (2012). Physical activity and free radicals, is a supplementation with antioxidants necessary? *Rev. Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y del Deporte*, 12(1577-0354), 369-388.
- Guerrero, C. (2012). Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en fibra dietética extraída de cultivos ancestrales andinos para su utilización como suplemento alimenticio (Vol. 109). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Rev. Elsevier: Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Jorgensen, P.M.; León, Y. S. (1999). Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador. En *Missouri Botanical Garden*.
- Lagos-Burbano, T.C., Ordóñez-Jurado, H., Criollo-Escobar, H., Burbano, S., and Martínez, Y. (2010). Descripción de frutales nativos de la familia Ericaceae en el altiplano de Pasto, Colombia. *Revista Colombiana Ciencias Hortícolas*, 4, 9-18.
- León- Yáñez, S., R Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. U. U. et H. N. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Quito, Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *Rev. The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- López Medina, D. L., Agudelo, C. A., Fonthal, G., & Ariza, H. (2017). Caracterización por espectroscopía infrarroja (FT-IR) de exudados gomosos de cinco especies de plantas presentes en el eje cafetero. *Rev. de Divulgación Científica y Tecnológica*, 31-37. Recuperado de http://bladel1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/5a13_Revista-2017-v4-definitivo-31-37.pdf
- Luna, L. C., Pigni, N. B., Torras-Claveria, L., Monferran, M. V., Maestri, D., Wunderlin, D. A., ... Tapia, A. (2013). Ramorinoa girolae Speg (Fabaceae) seeds, an Argentinean traditional indigenous food: Nutrient composition and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.004>
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. *Bot. Rev.*, 68, 55-87.



- Macedo M, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97-103. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v15n2/v15n2a3.pdf>
- Mercado, G., Carrillo, L., Wall, A., López, J., & Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Rev. Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 36-46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., & Someya, K. (1999). Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3,5-diglucoside, into Rats and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1083-1091. <https://doi.org/10.1021/jf9809582>
- Núñez Sellés, A. J. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: Retos y Oportunidades. *Rev. Cubana de Salud Pública*, 37, 644-652.
- Palacios, L. (2017). *Determinación de la capacidad antioxidante de bayas y frutos del bosque*. Universidad de JAÉN.
- Paredes, F., & Roca, J. (2002). Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Revisita Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(7), 96-100. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v15n2/v15n2a3.pdf>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Rev. Boliviana de Química*, 31(0250-5460), 68-81.
- Pérez Trueba, G. (2003). Los Flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22, 48-57.
- Piña Garza, E. (1996). Los radicales libres: beneficios y problemas: I. Introducción. *Rev. Gaceta. Médica de México*, 132(2), 183-184.
- Pique, T. & V. A. (2012). Uso De Espectroscopía Infrarroja Con Transformada De Fourier (Ftir) En El Estudio De La Hidratación Del Cemento. *Concreto y Cemento. Investigación y Desarrollo*, 3(2), 62-71.
- Plazas, E. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 182-199.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). The Polyphenols, Naturally Occurring Compounds with Beneficial Effects on Cardiovascular Disease. *Rev. Nutrición Hospitalaria*, 27, 76-89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Repo de Carrasco, R., & Encina Z., C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas Peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(2), 108-124. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2008000200004&fbclid=IwAR3_ooOLs4Xw7jx7D5cFxiQE00ByXQwmIfa vxgpAvffJNeajteVNjna7CCY
- Rivas Carrión, K. (2009). *Compendio de Botánica* (Primera). Cuenca, Ecuador.
- Robles S., R., Rojas G., M., Odriozola S., I., González A., G., & Martín B., O. (2009).



- Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut ' Kent ' mango (*Mangifera indica* L .). *Postharvest Biology and Technology journal*, 51, 384-390.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.003>
- Rouessac, F., & Rouessac, A. (2003). *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas* (Primera). Madrid: McGRAW-HILL.
- Rubinson K. Rubinson, J. (2004). *Análisis Instrumental* (Primera; I. Capella, Ed.). Madrid: Pearson Educación S.A-.
- Sánchez Valle, V., & Méndez Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad periodontal. *Rev. Medica Sur*, 70(6), 298-301.
- Simirgiotis, M. J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2010). Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 545-553. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.020>
- Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (2001). *Química Analítica* (7ma.). México D.F: McGRAW-HILL.
- Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2003). *Fundamentos de Química Analítica* (7ma.). España: Reverté.
- Tenorio Rodríguez, P. A. (2018). *Compuestos polifenólicos de macroalgas marinas : actividad antioxidante , antiinflamatoria y antibacteriana* (Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.). Recuperado de https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/949/1/tenorio_p.pdf
- Valencia, E., Figueroa, I., Sosa, E., Bartolomé, M., Martínez, H., & García, M. (2017). Polyphenols : antioxidant and toxicological properties. *Rev. Facultad de Ciencias Químicas*, (16), 15-29. <https://doi.org/1390-1869>
- Vallejo Zamudio, E., Rojas Velázquez, A., & Torres Bugarín, O. (2017). Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer : los antioxidantes.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Viada Pupo, E., Gómez Robles, Z., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *Rev. Correo Científico Médico de Holguín*, 21(1), 171-186.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.
<https://doi.org/10.1021/jf9908345>
- Wang, Shiow Y., & Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radical's, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5677-5684.
<https://doi.org/10.1021/jf000766i>



VI. ANEXOS

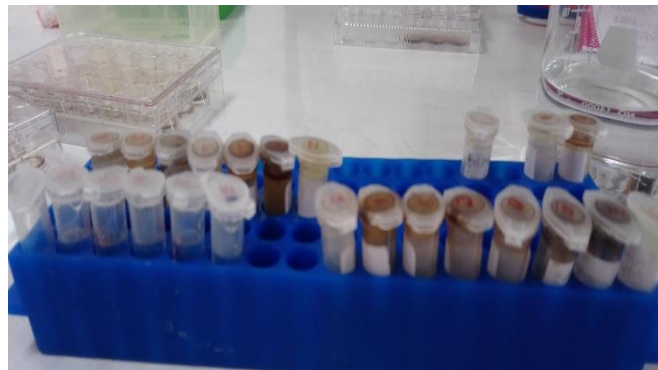
Anexo 1. Muestras empleadas para el análisis de compuestos fenólicos en donde se describe el método de extracción y fraccionamiento.

N° de muestras	Nombres de extractos y fracciones	Codificación
1	Extracción Soxhlet	A
2	Extracción Maceración	B
3	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad: Fracción 1	C1
4	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad: Fracción 2	C2
5	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad: Fracción 3	C3
6	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad Fracción: 4	C4
7	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad Fracción: 5	C5
8	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad Fracción: 6	C6
9	Extracción Maceración Cromatografía-Gravedad Fracción: 7	C7
10	Extracción Maceración Cromatografía- Bajo presión Fracción: 1	D1
11	Extracción Maceración Cromatografía- Bajo presión Fracción: 2	D2
12	Extracción Maceración Cromatografía- Bajo presión Fracción: 3	D3
13	Extracción Maceración Cromatografía- Bajo presión Fracción: 4	D4
14	Extracción Maceración Cromatografía- Bajo presión Fracción: 5	D5
15	Extracción Maceración Cromatografía- Bajo presión Fracción: 6	D6
16	Extracción Soxhlet Cromatografía- Bajo presión Fracción: 1	E1
17	Extracción Soxhlet Cromatografía- Bajo presión Fracción: 2	E2
18	Extracción Soxhlet Cromatografía- Bajo presión Fracción: 3	E3
19	Extracción Soxhlet Cromatografía- Bajo presión Fracción: 4	E4
20	Extracción Soxhlet Cromatografía- Bajo presión Fracción: 5	E5
21	Extracción Soxhlet Cromatografía- Bajo presión Fracción: 6	E6

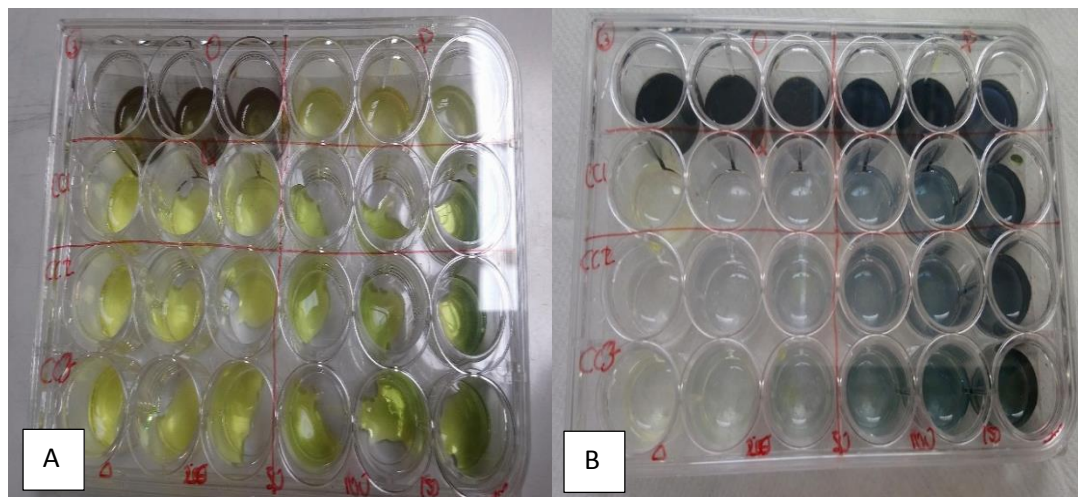
Fuente. Autoras.



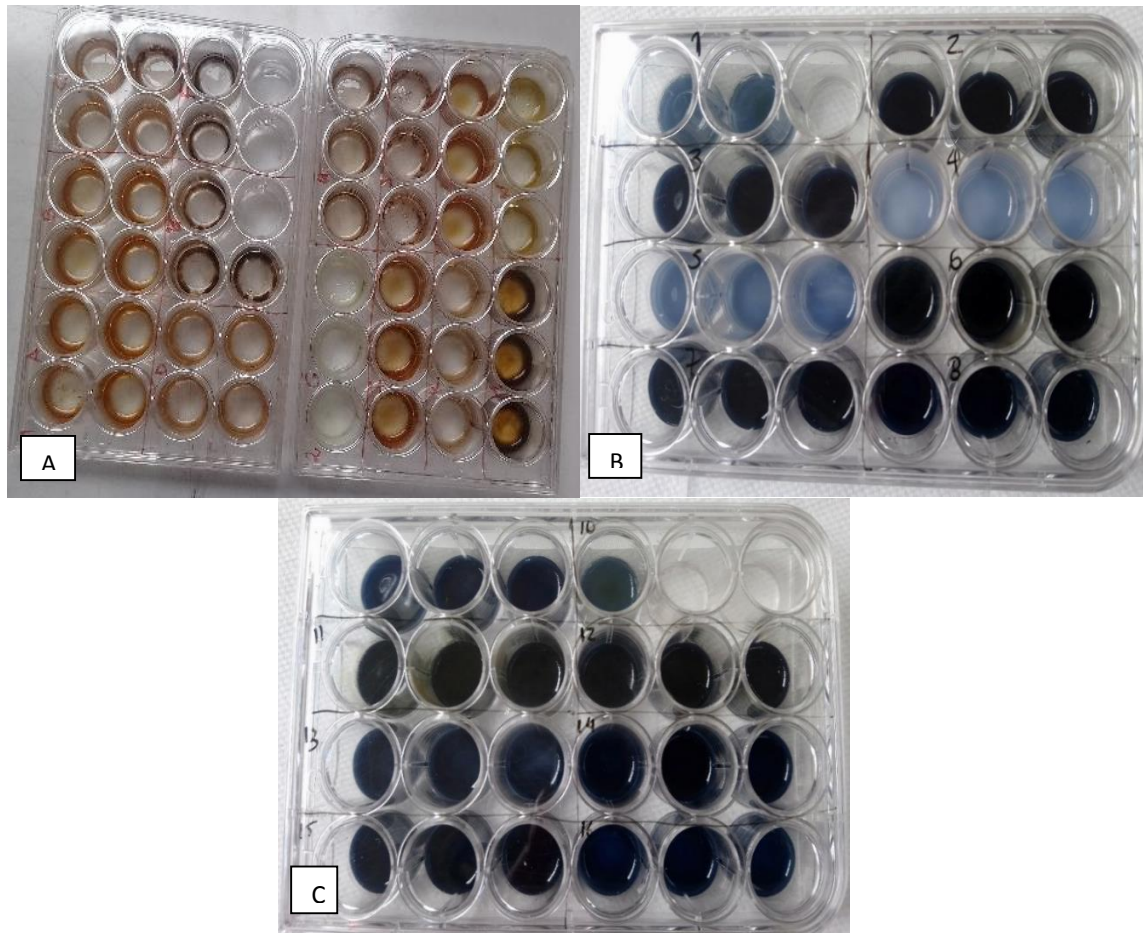
Anexo 2. Fracciones y extractos secos de *Macleania rupestris* empelados en los ensayos.



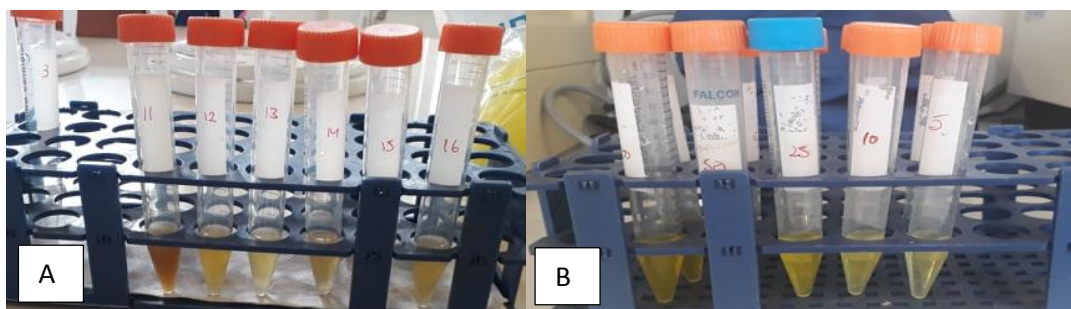
Anexo 3. Solución madre de las muestras con metanol, usados para la determinación de fenoles totales, flavonoides y antocianinas.



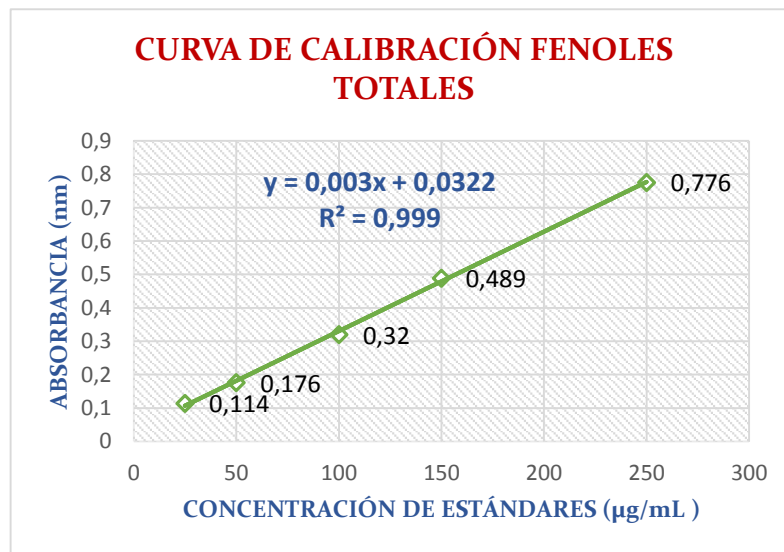
Anexo 4. Placas usadas para la elaboración de la curva de calibración de ácido gálico necesaria para la determinación de fenoles totales en los extractos y fracciones de *M. rupestris*. **A)** Pocillos con solución de ácido gálico en diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100, 150, 250 mg AG/ ml) utilizados para la curva de calibración (CC1, CC2, CC3); **B)** Se evidencia el desarrollo del color al adicionar el reactivo de Folin-Ciocalteu.



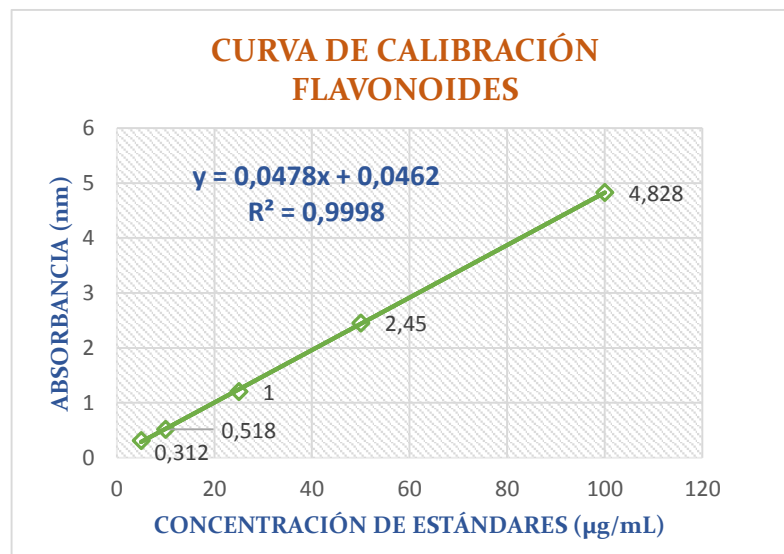
Anexo 5. Placas usadas para la determinación de fenoles totales de extractos y fracciones de *M. rupestris* realizado por triplicado. A) Pocillos con diluciones de las muestras, B y C) Pocillos con las muestras más carbonato de sodio y reactivo de Folin-Ciocalteu, observándose el desarrollo del color característico por la presencia de fenoles.



Anexo 6. A) Soluciones diluidas de extractos y fracciones empleados para la determinación de flavonoides; B) Soluciones estándar usados para la elaboración de la curva de calibración.



Anexo 7. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales, empleándose ácido gálico como patrón estándar Fuente. Autoras.



Anexo 8. Curva de calibración para la determinación de flavonoides, empleándose quercetina como patrón estándar. Fuente. Autoras.



Anexo 9 y 10. Tablas estandarizadas para la interpretación de espectros infrarrojos

Tabla 10B.1. Frecuencias de diferentes grupos en orden descendente del número de ondas

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo y asignación
3650–3600	Alcoholes, fenoles (diluidos), O—H tensión
3500–3300	Aminas primarias (doblete), aminas secundarias N—H tensión
3500–3200	Alcoholes, fenoles (H-enlazados), O—H tensión
3500–3100	Amidas N—H tensión
3400–2400	Ácidos carboxílicos, O—H tensión
~3300	Alquinos C—H tensión
3150–3050	Aromáticos C—H tensión
3100–3000	Alkenes C—H tensión
3000–2850	Alquenos C—H tensión
2900–2700	Alcanos C—H tensión
2550	Mercaptanos S—H tensión
2270–1950	Alenos, quetanos, isocianatos, isotiocianatos X=C=Y tensión
2260–2240	Nitrilos C≡N tensión
2250–2100	Alquinos C≡C tensión
1810 y 1760	Anhídridos C=O tensión
1800	Cloruros ácidos C=O tensión
1750–1730	Ésteres C=O tensión
1740–1720	Aldehídos C=O tensión
1725–1705	Cetones C=O tensión
1725–1705	Ácidos carboxílicos, C=O tensión
1715–1650	Amidas C=O tensión (banda I de amidas)
1690–1640	Iminas y oximas C=N tensión
1680–1600	Alquenos C=C tensión
1670–1640	Amidas C=O tensión (banda II de amidas)
1640–1550	Amidas primarias y aminas secundarias N—H flexión
1600 y 1475	Aromáticos C=C tensión
1465	Alqueno —CH ₂ — flexión
1450 y 1375	Alqueno —CH ₃ flexión
1400–1000	Fluoruro C—F tensión
1375–1300, 1200–1140	Sulfones, cloruros de sulfonilos, sulfatos, sulfoamidas S=O tensión
1350–1000	Aminas C—N tensión
1300–1000	Alcoholes, ésteres, éteres, —COOH, anhídridos C—O tensión
1150 y 1350	Nitro (R—NO ₂) N=O tensión
1050	Sulfóxidos S=O tensión
1000–650	Alquenos C—H fuera del plano de flexión
900–690	Aromáticos C—H fuera del plano de flexión
800–600	Cloruro C—Cl tensión
<667	Yoduro y bromo C—X tensión

Fuente. Rubinson K. Rubinson, 2004.



Tabla 10B.2. Tabla de correlación simplificada de vibraciones moleculares por tipo*

Tipo de vibración		Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad [†]
C—H	Alcanos (tensión)	3000–2850	f
	—CH ₃ (flexión)	1450 y 1375	m
	—CH ₂ — (flexión)	1465	m
	Alquenos (tensión)	3100–3000	m
	(fuera del plano de flexión)	1000–650	f
	Aromáticos (tensión)	3150–3050	f
	(fuera del plano de flexión)	900–690	f
	Alquino (tensión)	ca. 3300	f
	Aldehídos	2900–2800 2800–2700	d d
C—C	Alquenos	no interpretable	
C=C	Alqueno	1680–1600	m-d
	Aromáticos	1600 y 1475	m-d
C≡C	Alquino	2250–2100	m-d
C=O	Aldehído	1740–1720	f
	Cetona	1725–1705	f
	Ácidos carboxílicos	1725–1700	f
	Éster	1750–1730	f
	Amida	1670–1640	f
	Anhídridos	1810 y 1760	f
	Cloruro ácido	1800	f
	C—O	Alcoholes, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos, anhídridos	1300–1000
O—H	Alcoholes, fenoles		
	Libre	3650–3600	m
	enlace H	3500–3200	m
	Ácidos carboxílicos	3400–2400	m
N—H	Aminas y amidas primarias y secundarias (tensión)	3500–3100	m
	(flexión)	1640–1550	m-f
C—N	Aminas	1350–1000	m-f
C=C	Iminas y oximas	1690–1640	d-f
C≡N	Nitrilos	2260–2240	m
X=C=Y	Alenos, quetanos, isocianatos, isotiocianatos	2270–1950	m-f
N=O	Nitro (R—NO ₂)	1550 y 1350	f
S—H	Mercaptanos	2550	d
S=O	Sulfóxidos	1050	f
	Sulfones, cloruros de sulfonidos	1375–1300 y	f
	Sulfatos, sulfoamidas	1200–1140	f
C—X	Fluoruro	1400–1000	f
	Cloruro	800–600	f
	Bromuro, yoduro	<667	f

* Datos de Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. 1979. *Introducción a la espectroscopia: Guía para estudiantes de química orgánica.*

[†]f = fuerte, m = medio, d = débil.

Fuente. Rubinson K. Rubinson, 2004.



Anexo II. Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATP: Adenosín Trifosfato

ERO: Especies reactivas de oxígeno

IR: Espectroscopia Infrarroja

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar

NADP: Dinucleótido de Adenosín y Fosfato

pH: Potencial de Hidrógeno

RL: Radical Libre

UV: Ultravioleta