



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE UN EXTRACTO POLIFENÓLICO DEL MORTIÑO  
PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIONES DE ECUADOR

Autora

Karina Silvana Alarcón Barrera

Año  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE UN EXTRACTO POLIFENÓLICO DEL MORTIÑO  
PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIONES DE ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor guía

Ph.D. José Miguel Álvarez Suarez

Autora

Karina Silvana Alarcón Barrera

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA**

“Declaro haber dirigido el trabajo, Estudio de la composición química y la capacidad antioxidante de un extracto polifenólico del mortiño proveniente de diferentes regiones de Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Karina Silvana Alarcón Barrera, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

José Miguel Álvarez Suarez  
Doctor en Alimentación y Salud  
CC: 1756653372

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, Estudio de la composición química y la capacidad antioxidante de un extracto polifenólico del mortiño proveniente de diferentes regiones de Ecuador, de Karina Silvana Alarcón Barrera, en el 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Andrea Paola Cordero Arroyo  
Máster en Células Madre y Medicina Regenerativa  
CC: 1714664825

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Karina Silvana Alarcón Barrera

CC: 1723425748

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, a mis padres Michel y Estela y a mi hermano Alejandro por su apoyo en el transcurso de mi carrera. A mis compañeros Majo, David, Lizeth y Geno, por su amistad y ayuda en todo este tiempo. A José Miguel Álvarez por su enseñanza y orientación en el desarrollo de este trabajo.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su apoyo incondicional por culminar exitosamente esta carrera.

## RESUMEN

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una fruta endémica proveniente de los páramos del Ecuador, distribuido a través de la Cordillera de los Andes. El mortiño es un fruto rojo el cual se caracteriza por la presencia de compuestos bioactivos importantes como las antocianinas. El objetivo de esta investigación fue estudiar la composición química y la capacidad antioxidante del mortiño proveniente de tres páramos del Ecuador. La caracterización química de los principales compuestos fenólicos se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS), mientras que la capacidad antioxidante se determinó mediante la capacidad de reducir el hierro (FRAP) y el método antioxidante DPPH.

Mortiño de Pichincha mostró una concentración alta de compuestos bioactivos en comparación con los frutos provenientes de las otras dos regiones. También se demostró que el Mortiño presentó una variedad de compuestos polifenólicos como las antocianinas (cianidina hexósido, cianidina pentosida, aglicona de cianidina, derivados de delofonidina), proantocianinas (dímero de GC-epicatequina) y flavonoides (derivados del ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico). Por otro lado los análisis de la capacidad antioxidante evidenciaron altos valores para la propiedad biológica, lo que nos permite indicar que Mortiño puede considerarse como una importante fuente natural de compuestos bioactivos con efectos beneficios para la salud.



## ABSTRACT

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) is an endemic fruit from the paramos of Ecuador, distributed through the Andes mountains. Mortiño is a red fruit, which are characterized by the presence of bioactive compounds with importance such as anthocyanins. The objective of this research was to study the chemical composition and the antioxidant capacity of the mortiño from the three paramos of Ecuador. Chemical characterization of the principal phenolic compounds was carried out using high pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC/MS), while the antioxidant capacity was determined by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH method of antioxidant assay.

Mortiño from Pichincha showed a higher concentration of bioactive compounds compared to the fruits of the other two regions. It was also demonstrated that Mortiño showed a variety of polyphenolic compounds such as anthocyanins (cyanidin hexoside, cyanidin pentoside, aglycone of cyanidin, delphinidin derivatives), proanthocyanins (dimer of GC-epicatechin) and flavonoids (derivatives of the hydroxybenzoic acid and hydroxycinnamic acid). On the other hand, from the antioxidant capacity analysis high values were evidenced for the biological property, which allows us to indicate that Mortiño could be considered as an important natural source of bioactive compound with relevant effects for health.

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Objetivo General.....	4
1.4. Objetivos específicos .....	4
1.5. Justificación de la investigación.....	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Mortiño o Arándano Andino ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) .....	5
2.2 Distribución geográfica.....	6
2.2.1 Páramo de los Illinizas .....	7
2.2.1 Páramo de Chibuleo .....	9
2.2.1 Páramo del Cotopaxi .....	10
2.3 Composición química del Mortiño .....	11
2.3.1 Polifenoles .....	11
2.3.1.1 Flavonoides .....	13
2.3.1.1.1 Antocianinas .....	14
2.3.1.1.2 Taninos .....	15
2.3.2 Vitamina C .....	15
2.3.3 $\beta$ -Caroteno.....	16
2.3.4 Compuestos bioactivos presentes en el mortiño .....	17
2.4 Capacidad Antioxidante.....	17
2.4.1 Radicales Libres .....	17
2.4.2 Estrés Oxidativo.....	19
2.4.3 Capacidad Antioxidante del Mortiño .....	20
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL .....	20
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS .....	21

4.1. Población y Muestra .....	21
4.1.1 Población .....	21
4.1.2 Muestra .....	21
4.2. Preparación de las muestras del mortiño .....	22
4.3. Obtención de un extracto metanólico .....	22
4.4. Determinación de la composición química del mortiño .....	22
4.4.1 Determinación de fenoles totales .....	23
4.4.2 Determinación de flavonoides .....	23
4.4.3 Determinación de antocianinas .....	24
4.4.4 Determinación de taninos .....	25
4.4.3 Determinación de Vitamina C mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	26
4.4.3 Determinación de $\beta$ -Caroteno mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	27
4.5. Aislamiento y purificación de la fracción polifenólica .....	28
4.6. Identificación de compuestos polifenólicos mediante HPLC acoplado a espectrofotometría de masas .....	29
4.6.1 Análisis de antocianinas .....	30
4.6.2 Análisis de flavonoides y otros derivados fenólicos .....	31
4.7. Determinación de la capacidad antioxidante en las muestras de mortiño .....	31
4.7.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP .....	31
4.7.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH .....	33
4.8. Evaluación Estadística de los Resultados .....	33
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34

5.1. Composición química del mortiño .....	34
5.2. Cuantificación de polifenoles totales en mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrofotómetro de masas (HPLC/MS) .....	37
5.3. Capacidad antioxidante del mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) mediante los métodos de FRAP y DPPH .....	41
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>45</b>
6.1. Conclusiones.....	45
6.2. Recomendaciones .....	46
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Los alimentos de origen vegetal poseen efectos favorables sobre la salud del ser humano, por ejemplo los frutos rojos o “berries” presentan un gran contenido de nutrientes esenciales y fitoquímicos (Thompson, Pederick, Singh, & Santhakumar, 2017, pp. 131–138). A esto se les conoce como compuestos bioactivos (Romandini et al., 2013, pp. 169–179). Los compuestos bioactivos, mayormente polifenoles; han sido estrechamente relacionados con las propiedades biológicas de estos frutos, debido a su probada capacidad protectora ante el daño oxidativo a nivel celular (Diamanti et al., 2014, pp. 3935–3743).

Adicionalmente, los estudios realizados en frutos rojos demostraron que poseen una gran concentración de polifenoles, los cuales se han asociado a importantes funciones biológicas como estimulación de enzimas antioxidantes; disminución de los niveles intracelulares de radicales libres (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Tulipani et al., 2014, pp. 87–93), evitan el daño celular y retardan el envejecimiento progresivo (Giampieri et al., 2017, pp. 464–471).

Las antocianinas son un tipo de polifenoles que se encuentran en abundancia en los frutos rojos (Giampieri, Alvarez-Suarez, & Battino, 2014, pp. 3867–3876). Varios estudios han reportado que las antocianinas disminuyen la incidencia de enfermedades causadas por el estrés oxidativo (Romandini et al., 2013, pp. 169–179). Por lo que el consumo de frutos ricos en estos compuestos bioactivos; permitiría contribuir desde la dieta a reducir el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el daño oxidativo, como enfermedades cardiovasculares y el cáncer. (Giampieri, Alvarez-Suarez, & Battino, 2014, pp. 289–294).

Dentro del mantenimiento celular las mitocondrias son esenciales para mantener el equilibrio de los radicales libres y evitar el daño oxidativo (Giampieri et al., 2017, pp. 464–471). Desde hace varios años, muchos estudios se han centrado en la identificación de compuestos fenólicos capaces de interactuar con las mitocondrias con fines terapéuticos (Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182) buscando una alternativa de tratamiento ante el daño oxidativo.

Alvarez-Suarez y colaboradores (2016, pp. 38-49) demostraron que una de las posibles vías por la que los polifenoles ejercen su actividad antioxidante está relacionada con su capacidad para estimular las rutas metabólicas implicadas en la respuesta antioxidante, como la ruta AMPK/Nrf2 y la estimulación de la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa.

Giampieri y colaboradores (2016, pp. 128-197) evaluaron como los compuestos polifenólicos presentes en los frutos rojos poseen un poder protector ante el estrés oxidativo provocado por el agente quimioterapéutico doxorrubicina. Esto ofrece una nueva estrategia que sugiere el uso de compuestos bioactivos de estos frutos. La administración de estos compuestos bioactivos ayuda a evitar la toxicidad producida por la doxorrubicina ya que inhibe la producción de agentes reactivas de oxígeno y la acumulación de daño en los biomarcadores antioxidantes. Ratificando el potencial beneficio de estos frutos contra el daño oxidativo (Diamanti et al., 2014, pp. 3935–3943).

Tulipani y colaboradores (2014, pp. 87-93) demostraron que el consumo diario de estos frutos permite mejorar el estado antioxidante del plasma; ya que existe un aumento moderado en la capacidad antioxidante plasmática. Estos resultados sugieren que el consumo regular de estos frutos ayuda a mejorar las

defensas del organismo contra los posibles desafíos oxidativos que se pueden presentar.

El mortiño o arándano andino forma parte de los frutos rojos y es miembro de la familia Ericaceae. Es una fruta andina que se produce en los páramos del Ecuador a una altitud entre 3400 y 3800 metros sobre el nivel del mar (Cobo, Gutiérrez, Torres, & Torres, 2016, pp. 14–21). Esta fruta es empleada para la elaboración de la colada morada, un plato típico que se consume por el día de los difuntos como tradición en la cultura ecuatoriana (Torres, Trujillo, & Arahana, 2010, pp. 9–15). Dentro de la cultura indígena el mortiño es utilizado para obtener una infusión de su fruto, en donde concentran todos los antioxidantes y lo emplean para tratar enfermedades como la gripe o la diabetes (Coba et al., 2012, pp. 5–13). Actualmente ha despertado el interés gastronómico, ya que se la emplea en la elaboración de mermeladas, pasteles, helados, etc., esto se debe a sus características organolépticas que dan un mejor sabor a las comidas (Gallardo de la Puente, 2015, pp. 15–32).

Los estudios realizados sobre esta fruta se han centrado en la caracterización del perfil polifenólico, demostrando que posee una gran variedad de compuestos de este tipo, siendo las antocianinas los que se encuentran en mayor cantidad (Vasco, Riihinen, Ruales, & Kamal-Eldin, 2009, pp. 8274–8281).

## **1.2 Planteamiento del problema**

El exceso de producción de radicales libres lleva al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, neurológicas y cáncer. Esto se debe a un daño a nivel celular a consecuencia del estrés oxidativo (Thompson, Pederick, & Santhakumar, 2016, pp. 2169–2178). La medicina tradicional o ancestral despierta el interés

por buscar una alternativa de tratamiento para enfermedades causadas por el estrés oxidativo (OMS, 2002).

El Ecuador es un país multiétnico y pluricultural, por lo que la práctica de la medicina tradicional o ancestral lleva varios años en el país (Guacho, 2013, pp. 12–20). La medicina tradicional se caracteriza por emplear varios tipos de plantas o productos provenientes de ellas con fines terapéuticos (Gualavisí, 2008, pp. 6–27; Moscoso, 2013, pp. 10–70). La gran variedad botánica presente en toda la región Andina del Ecuador ha permitido el empleo de diversas plantas con estos fines (Moscoso, 2013, pp. 10–70). Sin embargo, no se sabe en su totalidad cuales son los compuestos bioactivos presentes en el mortiño, además falta interés de incluirlos como parte de la dieta del ser humano.

### **1.3 Objetivo General**

Determinar la composición química y la capacidad antioxidante de un extracto de Mortiño.

### **1.4 Objetivos específicos**

- Determinar la composición química del Mortiño mediante técnicas espectrofométricas y HPLC.
- Obtener un extracto rico en polifenoles y cuantificar los polifenoles totales mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas.
- Evaluar la capacidad antioxidante del mortiño empleando el reactivo de FRAP y DPPH.



## 1.5 Justificación de la investigación

El estudio de los frutos rojos y sus derivados demuestran que tienen un impacto positivo en la salud humana ante diversas enfermedades causadas por el daño oxidativo. La gran cantidad de contenido de compuestos polifenólicos como las antocianinas, taninos, etc.; y de otros compuestos como vitaminas y minerales, son los que más beneficios aportan para la salud debido a los efectos biológicos.

El mortiño (perteneciente a los frutos rojos) debido a su gran contenido de polifenoles despierta el interés de estudio como una fuente natural de compuestos bioactivos con propiedades que benefician a las células, enfatizando en el papel antioxidante de esta fruta endémica del Ecuador.

Esto conllevaría a realizar de nuevos estudios con el fin de conocer cómo los compuestos bioactivos presentes en estos frutos; provenientes de la región Andina del Ecuador, son candidatos como una alternativa natural a tratamientos para enfermedades causadas por el daño oxidativo. Además, de despertar el interés de incluir estos frutos en la dieta diaria, como fuente natural de compuestos bioactivos beneficiosos para el ser humano.

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Mortiño o Arándano Andino (*Vaccinium floribundum* Kunth)

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una fruta endémica de los páramos de las regiones andinas, distribuyéndose, en el caso de Ecuador, a nivel de toda la Cordillera de los Andes. Pertenece a la familia de las Ericáceas, se caracteriza por ser un arbusto pequeño con 2,5 m de altura, posee ramificaciones con hojas de 2 cm de largo y flores a manera de racimos con aproximadamente 6 a 10 flores en cada uno (Figura 1) (Roldán, 2012, pp. 1–8; Torres et al., 2010, pp. 9–15). Sus frutos se caracterizan por ser bayas de color

negro o vino oscuro, redondas, con un diámetro de 7 mm situados en racimos (Vasco et al., 2009, pp. 8274–8281).

En Ecuador no existen cultivos comerciales de esta fruta, su cultivo consiste en la colecta de los frutos crecidos de forma silvestre por comunidades indígenas de la zona. El uso de estos frutos es muy extendido en este tipo de comunidades, quienes la utilizan desde tiempos antiguos como alimento y con fines terapéuticos (Roldán, 2012, pp. 1–8; Tupuna, Vera, & Ruales, 2016, pp. 1–11). Desde mediados de octubre a inicios de noviembre se encuentra al mortiño con mayor facilidad en todos los mercados locales ya que se emplea para preparar la “colada morada”, un plato tradicional del Ecuador que se realiza por el día de los difuntos (Schreckinger, Lotton, Lila, & de Mejia, 2010, pp. 233–246; Tupuna et al., 2016, pp. 1–11).



*Figura 1.* Planta de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en su proceso de maduración.

Tomado de (Torres, *et al*, 2010, pp. 5-13).

## **2.2 Distribución geográfica**

El género *Vaccinium* se encuentra distribuido por América del Norte, América Central y América del Sur, especialmente en los países que forman parte de la Cordillera de los Andes (Roldán, 2012, pp. 1–8).

En el Ecuador existen tres especies del mortiño, siendo *Vaccinium floribundum* la que tiene mayor distribución en los páramos ecuatorianos. Esta especie se encuentra aproximadamente de 1600 a 4500 metros sobre el nivel del mar. Se localiza con mayor abundancia en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Loja, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Imbabura, Tungurahua y Zamora (Figura 2) (Gallardo de la Puente, 2015, pp. 15–32). El clima predominante en los páramos ecuatorianos es frío, con temperaturas que oscilan entre 8 y 16°C debido a la gran altitud y la alta tasa de neblina e irradiación solar que presenta durante el día. Los suelos, por su parte, tienen tendencia a ser húmedos (Coba et al., 2012, pp. 5–13).



Figura 2. Distribución geográfica del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en el Ecuador.

Tomado de (Roldán, 2012, pp. 1-8).

2.2.1 Páramo de los Illinizas: también conocido como reserva ecológica Los Illinizas, fue declarada reserva ecológica y Patrimonio Nacional de Áreas Naturales de Estado. Se encuentra ubicada en la Sierra Central hacia la parte occidental de la Cordillera de los Andes y abarca desde la provincia de Pichincha hasta Cotopaxi. En la provincia de Cotopaxi incluye los cantones de

Latacunga, La Maná, Pujilí, Sigchos y Pangua mientras que en la provincia de Pichincha incluye el cantón Mejía (Calvopiña et al., 2008, pp. 1–39; Quito Adventure, 2016). Es una reserva que se encuentra a una altitud entre los 800 a 5.265 metros sobre el nivel del mar. Posee una extensión de 149.900 hectáreas, de las cuales 30.800 son páramo y 119.100 hectáreas son bosque subtropical occidental (*Figura 3*) (Calvopiña et al., 2008, pp. 1–39; Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2012, pp. 1–4).

La Reserva Ecológica los Illinizas se caracteriza por poseer una gran riqueza de flora y fauna endémica del Ecuador. Esta reserva es un potencial turístico debido a sus paisajes sobresalientes, dentro de los que se destacan la Cordillera Lelia, Cerros Illinizas, El Corazón, Jaligua Alto, Tenefuerte y la Laguna de Quilotoa (Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador, 2015b).

El clima en esta zona se caracteriza por presentar temperaturas entre 9 y 11 °C, sin embargo puede alcanzar temperaturas extremas entre 0 y 22 °C. En los meses de abril y octubre presenta altas tasas de lluvias mientras que en los meses de verano, de junio a agosto, se caracterizan por ser meses de sequía en la zona (Calvopiña et al., 2008, pp. 1–39; Villalta, 2016, pp. 4–8).

El suelo de esta reserva ecológica presenta un alto contenido de “alofana”, esto permite que el suelo de esta zona posea texturas limosas. La presencia de arena fina le da una particularidad de esponjosidad, atribuyéndole así la capacidad de retener agua y nutrientes necesarios para el crecimiento de plantas endémicas de la zona (Calvopiña et al., 2008, pp. 1–39; Villalta, 2016, pp. 4–8).

En el páramo de los Illinizas la vegetación es muy extensa, se puede encontrar árboles de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), y otras especies como árboles de papel, chochos de monte, etc., (Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador, 2015b).



*Figura 3.* Reserva Ecológica de los Illinizas

Tomado de (Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador, 2015).

2.2.2 Páramo de Chibuleo: o también conocido como UNOPUCH, se localiza al Sur-Occidente del cantón Ambato, provincia de Tungurahua (*Figura 4*). Las comunidades que forman parte del Pueblo Chibuleo son los principales habitantes de esta zona del páramo (Charco, 2015, pp. 20–32). Este páramo cuenta con una extensión de aproximadamente 1000.92 hectáreas y está situado a una altura entre los 3.700 a 4.050 metros sobre el nivel del mar (Gobierno Provincial de Tungurahua, 2015, pp. 20–22; Obrocki & Goerres, 2012, pp. 2–9).

La temperatura que puede alcanzar esta zona es de 10 °C. En los meses de marzo a junio presenta lluvias abundantes, mientras que en los meses de septiembre a diciembre es temporada de sequía (Gobierno Provincial de Tungurahua, 2015, pp. 23–190).

El páramo de Chibuleo se caracteriza por tener una abundante flora endémica de los Andes del Ecuador, donde se encuentran especies como ñachag, pumamaqui y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en mayor abundancia. Según la ubicación del Páramo de Chibuleo, las fuentes cercanas de agua permiten que el suelo sea apto para la agricultura silvestre y aporta a la biodiversidad de plantas nativas del Ecuador (Obrocki & Goerres, 2012, pp. 2–9).



*Figura 4.* Páramo de Chibuleo

Tomado de (Goerres y Obrocki, 2012, pp. 2-9).

2.2.3 Páramo del Cotopaxi: la zona del páramo se extiende por las faldas de los volcanes Cotopaxi y Rumiñahui (Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2010, pp. 77–92). El Parque Nacional Cotopaxi abarca un total de 33.393 hectáreas y se localiza en las provincias de Pichincha, Cotopaxi y Napo. El parque se extiende desde el volcán Cotopaxi hasta el volcán Rumiñahui en sentido al occidente, y por sus hermosos paisajes es un parque con gran potencial turístico (Jácome, 2009, pp. 2-10). El páramo se encuentra a una altitud entre los 3.900 y 4.400 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas que oscilan entre los 3 y 6 °C (Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2010, pp. 77–92).

Al presentar un clima extremo durante todo el año, su biodiversidad se ha adaptado a vivir en estas temperaturas. El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) no es muy predominante en esta zona, sin embargo se pueden

encontrar algunos arbustos (Jácome, 2009, pp. 2-10; Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador, 2015).



*Figura 5.* Parque Nacional Cotopaxi

Tomado de (Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador, 2015).

### **2.3 Composición química del Mortiño**

Los estudios fitoquímicos realizados en el fruto del mortiño evidencian que posee una gran cantidad de compuestos antioxidantes, como polifenoles, carotenoides y vitamina C, los cuales han sido asociados a importantes efectos protectores ante enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el daño oxidativo (Cobo et al., 2016, pp. 14–21).

#### **2.3.1 Polifenoles**

Se encuentran en gran cantidad de vegetales, café, té y frutas (Scalbert et al., 2005, pp. 287–306). Estos compuestos se caracterizan por presentar en su estructura química una o varios anillos de fenol o aromáticos con uno o varios grupos hidroxilo como sustituyentes. Los polifenoles se clasifican en función al número de anillos presentes en su estructura química; (*Figura 6*) (Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182).

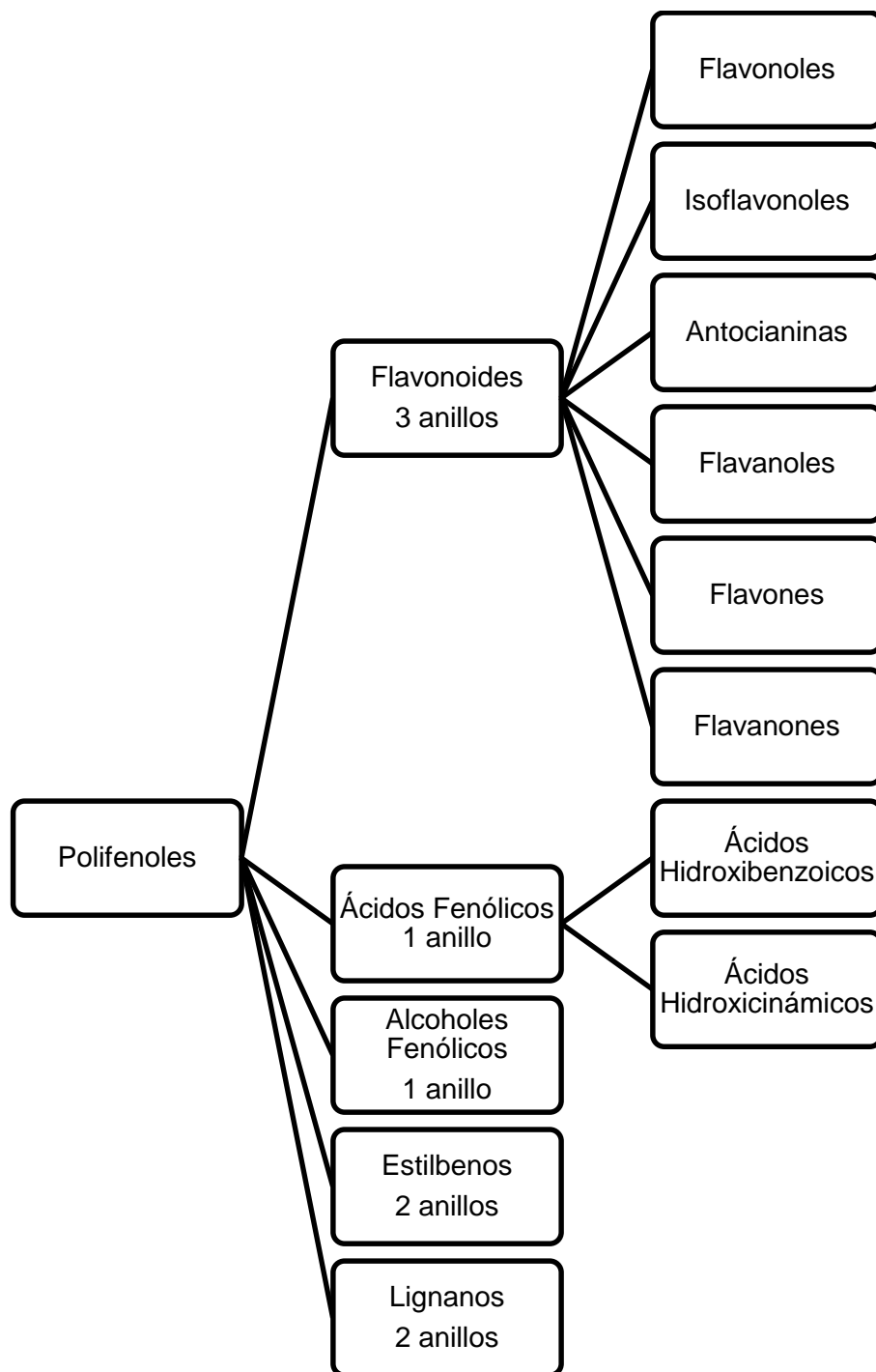
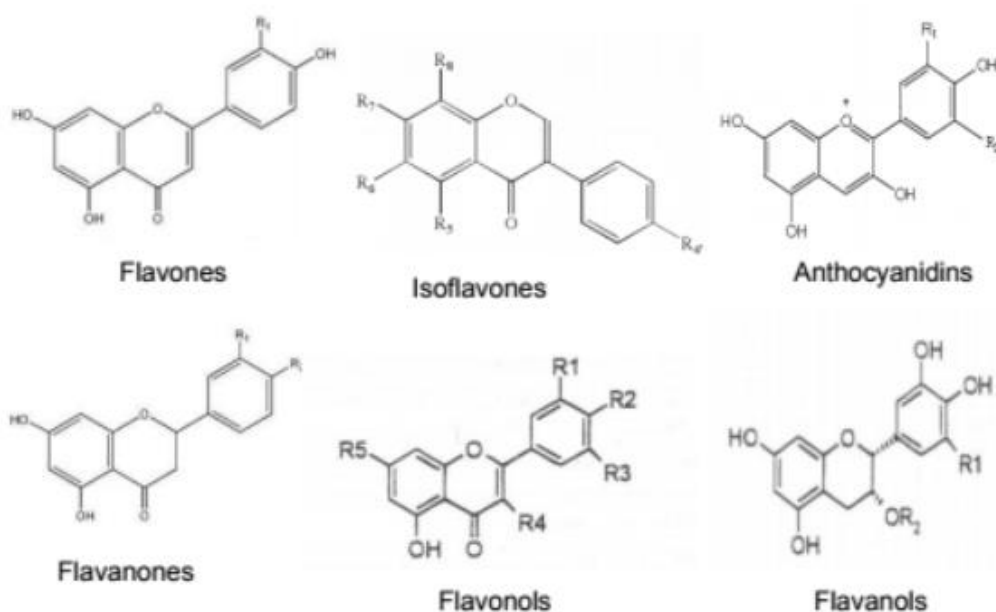


Figura 6. Clasificación de los compuestos polifenólicos.  
Adaptado de (Forbes-Hernández, 2014, pp. 154-182).



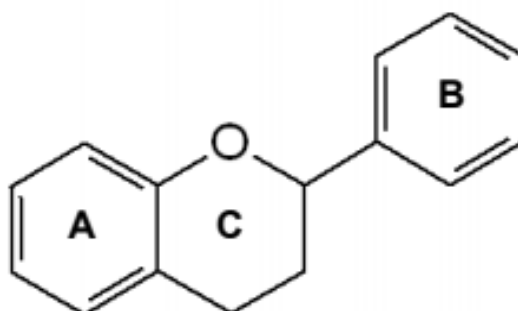
### 2.3.1.1 Flavonoides

Son el grupo más numeroso dentro de los polifenoles. Se clasifica en 6 subclases según su estructura química (*Figura 7*), la cual se caracteriza por tener dos anillos de benceno unidos mediante una cadena lineal de tres carbonos y una cadena común de carbono de difenil propanos (*Figura 8*) (Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182).



*Figura 7.* Estructura química de las 6 subclases de flavonoides.

Tomado de (Dwyer & Erdman, 2015, pp. 15-16).



*Figura 8.* Estructura química básica de los flavonoides

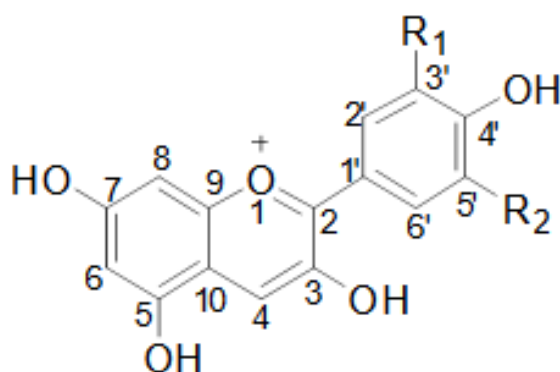
Tomado de (Dwyer & Erdman, 2015, pp. 15-16).

### 2.3.1.1.1 Antocianinas

Pertenecen a una subclase de los flavonoides y son pigmentos solubles en agua que se encuentran en gran cantidad en los frutos rojos, proporcionando el color rojo, azul, morado o vino característico de este tipo de frutas. Son compuestos glucósidos representados en varias formas de agliconas o también conocidas como antocianidinas (Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182; Mattera et al., 2017, pp. 1–43).

La estructura química básica de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirilio o también conocido como flavilio. Los azúcares se unen mediante enlaces glucosídicos al grupo hidroxilo en el C-3 del anillo de carbono (*Figura 9*). Las subclases de antocianinas se basa en función al número de grupos hidroxilo, el número de azúcares unidos a la molécula, la posición del azúcar y el número de anillos alifáticos o aromáticos que se encuentran enlazados a los azúcares (Su, 2012, pp. 7–37).

Adicionalmente, las antocianinas presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y efectos quimioterapéuticos, ya que actúan a nivel mitocondrial regulando el potencial de la membrana, cadena respiratoria y permeabilidad (Mattera et al., 2017, pp. 1–43).



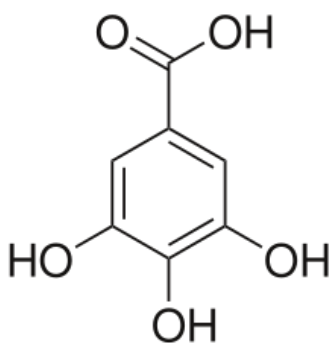
*Figura 9.* Estructura química básica de las antocianinas.

Tomado de (Su, 2012, pp. 7-37).

### 2.3.1.1.2 Taninos

Los taninos o también conocidos como proantocianidinas (PA), pertenecen a la subclase de los flavonoles. Son compuestos poliméricos con un alto peso molecular y una estructura química formada por monómeros de flavan-3-ol (*Figura 10*) (Fine, 2000, pp. 144–151; Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182; Rinaldi, Iturmendi, Jourdes, Teissedre, & Moio, 2015, pp. 667–676). Proporcionan el sabor “amargo” o “astringente” a las frutas y también son pigmentos de color azulado o negro (Gallardo de la Puente, 2015, pp. 15–32).

Tienen propiedades antioxidantes por lo que su consumo permite disminuir el riesgo de enfermedades provenientes del metabolismo como son el cáncer, estrés oxidativo y cardiovasculares (Mattera et al., 2017, pp. 1–43).



*Figura 10.* Estructura química básica de los taninos.

Tomado de (Fine, 2000, pp. 144-151).

### 2.3.2 Vitamina C

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, presenta varios elementos en su estructura química: la lactona, dos grupos hidroxilos enólicos y un grupo de alcohol primario y secundario (*Figura 11*) (Contreras-Calderón, Calderón-Jaimes, Guerra-Hernández, & García-Villanova, 2011, pp. 2047–2053).

Es una molécula con grandes fines terapéuticos ya que su déficit desarrolla la enfermedad conocida como escorbuto. También permite disolver el calcio que puede tapar la vena aorta y reduce la presencia de trombos en la sangre (Contreras-Calderón et al., 2011, pp. 2047–2053; Gallardo de la Puente, 2015, pp. 15–32).

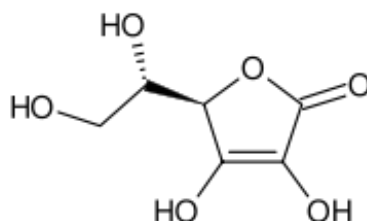


Figura 11. Estructura química del ácido ascórbico

Tomado de Contreras-Calderón, et al, 2011, pp. 2047-2053.

### 2.3.3 $\beta$ -Caroteno

Pertenece a grupo de los carotenoides y a la familia de los terpenos (Figura 12). Los carotenos son pigmentos naturales de color rojo, amarillo y naranja (Beserra et al., 2011, pp. 2155–2159).

El organismo se encarga de transformar al  $\beta$ -caroteno en retinol o vitamina A. Presenta actividad antioxidante y anticancerígena por lo que está involucrado en la prevención de enfermedades degenerativas (Cândido, Silva, & Agostini-Costa, 2015, pp. 313–319).

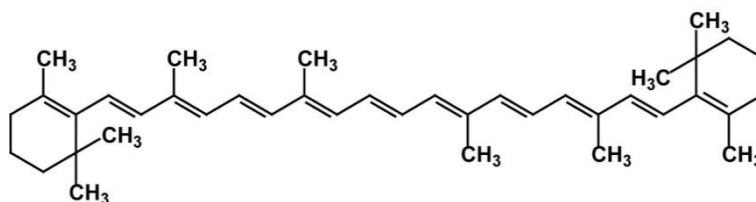


Figura 12. Estructura química de  $\beta$ -caroteno

Tomado de (Beserra, 2011, pp. 2155-2159).

### 2.3.4 Compuestos bioactivos presentes en el mortiño

En la tabla 1 se muestra los compuestos polifenólicos que han sido identificados en el mortiño.

Tabla 1.

*Compuestos polifenólicos del mortiño*

Compuestos polifenólicos	Referencia
<b>Ácido gálico y Esteres galloólicos</b>	
Ácido gálico	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
<b>Derivados del ácido hidroxibenzoico</b>	
Ácido vanílico	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
Ácido p-hidroxibenzoico	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
<b>Flavan-3-oles y proantocianidinas</b>	
Epicatequina	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
Catequina	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
<b>Derivados de flavonol</b>	
Quercetina	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
Miricetina	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
<b>Derivados del ácido hidroxicinámico</b>	
Ácido clorogénico	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
Ácido cafeico	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
Ácido p-coumaric	Vasco, et al, 2009, pp. 8276.
<b>Antocianinas</b>	
Cianidina-3-glucósido	Vasco, et al, 2009, pp. 8276 & Su, 2012, pp. 147.
Delfinidina-3-glucósido	Vasco, et al, 2009, pp. 8276 & Su, 2012, pp. 147.

## 2.4 Capacidad Antioxidante

### 2.4.1 Radicales Libres

Son especies químicas que presentan en su estructura uno o más electrones desapareados o libres. Los radicales libres son uno de los principales productos de la respiración mitocondrial (Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182).

Existen dos tipos de radicales libres: las Especies Reactivas de Oxígeno o también denominadas ROS y las Especies Reactivas de Nitrógeno o RNS. Los radicales superóxido, hidroxilo, peróxido y alcoxilo forman parte de los ROS, mientras que el radical óxido nítrico y los productos provenientes de la reacciones químicas entre el nitrito con el oxígeno molecular pertenecen al grupo de los RNS (Fallarero, 2005, pp. 7–11; Mattera et al., 2017, pp. 1–43).

Tanto los ROS como los RNS se originan en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria durante el proceso de respiración celular (Forbes-Hernández et al., 2014, pp. 154–182). Además forman parte de vías de señalización (Fallarero, 2005, pp. 7–11); como regulación del tono vascular, presión de oxígeno y aumentan la transducción de señales intracelulares de algunos receptores de la membrana plasmática (Korc, Bidegain, & Martell, 1995, pp. 121–135).

Los radicales libres también se involucran en la síntesis de las prostaglandinas, colesterol y hormonas esteroideas. La biosíntesis del colágeno, la hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina está mediada por la presencia del radical libre OH. La producción normal de radicales libres en el organismo a nivel celular controla las reacciones del tipo redox que el metabolismo necesita para su correcto funcionamiento. De ahí la importancia de mantener los niveles de radicales libres en una dosis adecuada que el ser humano necesita; sin embargo esta concentración óptima no se mantiene debido a los malos hábitos alimenticios (Venereo, 2002, pp. 126–133).

El exceso de los radicales libres en las células ocasionan un daño oxidativo o estrés oxidativo llevando a que se desarrolle el envejecimiento y muerte celular (Fallarero, 2005, pp. 7–11). Los radicales libres presentan una vida media muy baja, pero poseen una capacidad química muy alta por lo que reaccionan con

toda molécula que se encuentre en su alrededor (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Caballos, & Méndez, 2010, pp. 32–39).

Dentro de los principales daños que los radicales libres pueden ocasionar se encuentra el daño oxidativo a macromoléculas (Beserra et al., 2011, pp. 2155–2159). Estos daños son los siguientes:

- Lípidos: se produce la preoxidación lipídica, es decir que actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados alterando la permeabilidad de la membrana celular y provoca alteraciones en su función lo que puede producir la muerte celular (Maldonado et al., 2010, pp. 32–39).
- Proteínas: provoca la oxidación de los aminoácidos fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. También altera el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas y provoca la formación de grupos carbonilos que alteran la estructura química de las proteínas (Maldonado et al., 2010, pp. 32–39).
- Ácido desoxirribonucleico: las proteínas provienen de la expresión de genes, los radicales libres pueden provocar mutaciones a nivel de ADN; lo que conlleva a una pérdida en la expresión de genes específicos o que no exista la síntesis de alguna proteína específica por daño en la secuencia codificante (Maldonado et al., 2010, pp. 32–39).

#### **2.4.2 Estrés oxidativo**

Se refiere a la alteración del balance entre la producción de oxidantes antioxidantes; es decir, existe mayor producción y acumulación de oxidantes, lo cual provoca un desequilibrio en el balance redox de la célula (Venereo, 2002, pp. 126–133). Como resultado del daño oxidativo a las macromoléculas se predisponen al organismo al desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Cabral et al., 2009, pp. 469–475; Korc et al., 1995, pp. 121–135).

### 2.4.3 Capacidad Antioxidante del Mortiño

Se conocen como antioxidantes a las sustancias que permiten neutralizar a los radicales libres y también retrasan las reacciones de oxidación, controlando así el equilibrio de oxidación y evitando el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Gaviria et al., 2009, pp. 519–528).

El género *Vaccinium* ha despertado gran interés debido a la presencia de compuestos bioactivos, sobre de polifenoles, que tienen actividad antioxidante. Vasco, et al., (2009, pp. 8274-8281) enuncia que el mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) presenta compuestos polifenólicos como la quercetina, ácidos hidroxicinámicos y antocianinas. Estos últimos en mayor abundancia en la cáscara del fruto y dichos compuestos tienen una alta tasa de actividad antioxidante. Estos resultados permiten proponer al mortiño como candidato para ser utilizado como alimento funcional y contribuir de este modo al aporte a través de la dieta de compuestos bioactivos con capacidad de prevenir el daño oxidativo y por ende disminuir la predisposición a padecer enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Coba et al., 2012, pp. 5–13; Su, 2012, pp. 7–37).

## 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL



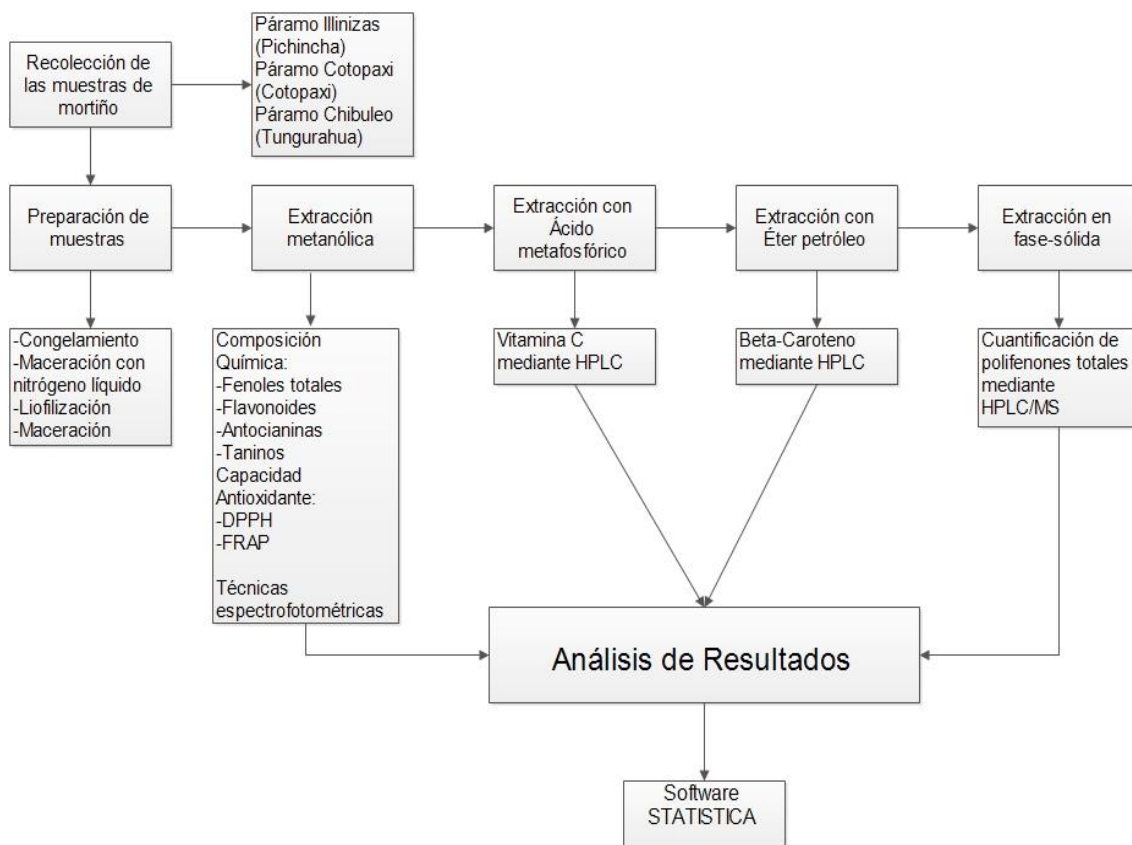


Figura 13. Diagrama de flujo del Diseño del Plan Experimental.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1 Población y Muestra

#### 4.1.1 Población:

La población es la fruta de mortiño proveniente de los páramos del Ecuador.

#### 4.1.2 Muestra

Los especímenes (*Vaccinium floribundum*) fueron identificados por especialistas del Jardín Botánico de Quito, Ecuador, utilizando las muestras de referencia depositadas en el herbario de dicho centro. Las muestras de mortiño fueron obtenidas de los mercados locales de la provincia de Pichincha. Del mercado de Iñaquito al norte de la ciudad de Quito se obtuvo el mortiño Ambato proveniente del Páramo de Chibuleo. En el mercado de San Sebastián

en el cantón Sangolquí, se obtuvieron el mortiño Pichincha proveniente del Páramo de los Illinizas y el mortiño Cotopaxi proveniente del Páramo Cotopaxi.

## **4.2 Preparación de las muestras de mortiño**

Las frutas del mortiño fueron maceradas con nitrógeno líquido utilizando un mortero y pistilo. El producto fue colocado en un vaso liofilizador y almacenado a -80 °C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas por 48 horas hasta eliminar todo el contenido de humedad y se maceró para obtener el polvo liofilizado que fue almacenado en tubos cónicos de 50 mL a una temperatura de -20 °C.

## **4.3 Obtención de un extracto metanólico**

El extracto metanólico se obtuvo mediante el método descrito por Batista y colaboradores (2017, pp. 284-291). Primero se pesó 1 g de cada una de las muestras liofilizadas y se colocó en 100 mL de solución de extracción compuesta por metanol/agua (proporción 80:20 v/v). Las muestras fueron agitadas constantemente a 350 rpm aproximadamente por 2 horas en oscuridad.

Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron (Eppendorf/Synergy HT) a 5.000 rpm durante 5 minutos en tubos cónicos de 50 mL. Se filtró el sobrenadante y se almacenó en frascos boecos de vidrio color ámbar a -20 °C. Este extracto fue utilizado para la determinación de la composición química de fenoles, flavonoides, antocianinas y la capacidad antioxidante.

## **4.4 Determinación de la composición química del mortiño**

### **4.4.1 Determinación de fenoles totales**

Los fenoles totales se determinaron mediante el método descrito por Singleton y colaboradores (1998, pp. 152-178). Se prepararon las siguientes soluciones:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) (Sigma-Aldrich) a 0,2 N.
- Solución de Carbonato de sodio (3,75 g en 50 mL)

El extracto metanólico de las muestras de mortiño fueron diluidas en solución de extracción del paso 4.3 en proporción 1:10. El procedimiento fue realizado por triplicado en tubos de 1,5 mL. Se colocaron 100  $\mu$ L de la muestra diluida y se añadieron 500  $\mu$ L de la solución de Folin-Ciocalteu. Los tubos se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 400  $\mu$ L de la solución de carbonato de calcio.

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 2 horas. Se generó una muestra blanco en la cual se colocaron 100  $\mu$ L de la solución de extracción como reemplazo de la muestra. La absorbancia de las muestras fue medida en espectrofotómetro (Shimadzu/UV mini-1240) a 760 nm.

La curva de calibrado fue realizada con un estándar de ácido-gálico (LOBA-CHEMIE) en un rango de 0,1875 - 0,75 mM., y se utilizó para calcular la concentración de fenoles totales en cada una de las muestras. Los resultados fueron expresados en miligramos Ácido Gálico sobre gramo de fruto seco (mg GAE/g FW).

#### **4.4.2 Determinación de flavonoides**

Los flavonoides se determinaron mediante el método descrito por Chang y colaboradores (2002, pp. 178-182). Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de Cloruro de Aluminio Hexahidratado (Loba-Chemie) ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) al 10 %

- Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 1 M
- Solución de Nitrito de Sodio (NaNO<sub>2</sub>) al 5 %

Para esta prueba se realizó una dilución 1:10 de los extractos metanólicos de las muestras de mortiño. En una placa de 96 pocillos se colocaron 20 µL de las muestras diluidas y se añadieron 100 µL de agua destilada. Se adicionaron 6 µL de la solución de NaNO<sub>2</sub> y se incubó a temperatura ambiente por 6 minutos. Se añadieron 12 µL de la solución de AlCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y por último se añadieron 40 µL de NaOH 1M y 22 µL de agua destilada. El procedimiento se realizó por triplicado y se generó una muestra blanco donde se colocaron 20 µL de agua destilada en reemplazo de la muestra. Las absorbancias fueron medidas a 510 nm en un lector de placas (Biotek/Synergy HT) utilizando un *background* en función de la muestra blanco.

La curva de calibrado fue realizada con un estándar de Catequina (Cayman) en un rango de 0,0625 - 0,5 mg/mL y se utilizó para calcular la concentración de flavonoides en cada una de las muestras. Los resultados fueron expresados en miligramo de Catequina sobre gramo de fruto seco (mg Cat/g FW).

#### 4.4.3 Determinación de antocianinas

Las antocianinas se determinaron mediante una prueba diferencial de pH (Coklar & Akbulut, 2017, pp. 166–174), para lo cual se realizaron dos soluciones tampón:

- Solución Tampón 1: Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich) (KCl) 0,025 M a pH 1.
- Solución Tampón 2: Acetato de sodio tri-hidratado (Sigma-Aldrich) (CH<sub>3</sub>COONa\*3H<sub>2</sub>O) 0,4 M a pH 4,5

El extracto metanólico de las muestras de mortiño Ambato y Pichincha se les realizó una dilución 1:10, pero al extracto metanólico de la muestra mortiño

Cotopaxi no se realizó dilución. En un tubo de 1,5 mL se colocaron 100 µL de la muestra correspondiente y se añadieron 900 µL de la solución Tampón 1. En otro tubo de 1,5 mL se colocaron 100 µL de la muestra correspondiente y se añadieron 900 µL de la solución Tampón 2. El procedimiento se realizó por triplicado y se generó dos muestras blanco donde se colocaron 100 µL de agua destilada en reemplazo de la muestra y 900 µL de cada solución tampón. Las absorbancias fueron medidas a 200 y 700 nm. El resultado final se obtuvo utilizando la fórmula descrita en la Ecuación 1.

$$Abs = (Abs_{500} - Abs_{700})_{pH 1} - (Abs_{500} - Abs_{700})_{pH 4.5} \quad (\text{Ecuación 1})$$

La curva de calibrado fue realizada con un estándar Perlagonidina (Sigma-Aldrich) en un rango de 5 – 150 mg/L y se utilizó para calcular la concentración de antocianinas en cada una de las muestras a partir de los resultados obtenidos de la Ecuación 1. Los resultados fueron expresados en miligramo de Perlagonidina equivalente sobre gramo de fruto seco (mg Pg Eq/g FW).

#### 4.4.4 Determinación de taninos

Los taninos se determinaron mediante el método descrito por la Norma ISO 9648 (1988). Se pesaron 0.05 g de muestra liofilizada y se añadió 1 mL de N-N dimetilformamida, se agitó por 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras fueron centrifugadas a 1.000 G por 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se realizó una dilución 1:10 donde se añadieron 100 µL del sobrenadante con 900 µL agua destilada.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución Amoniacal al 25 %
- Solución de Citrato férrico (3,5 g/L)

En una placa de 96 pocillos se realizó por triplicado la reacción. Se añadieron 2,2  $\mu\text{L}$  de muestra, 143,8  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 27  $\mu\text{L}$  de solución amoniacal y 27  $\mu\text{L}$  de solución de citrato férrico. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente por 10 minutos. Se realizó una muestra blanco en donde se colocó 2,2  $\mu\text{L}$  de agua en reemplazo de la muestra. Las absorbancias fueron medidas a 525 nm en un lector de placas.

La curva de calibrado fue realizada con un estándar de Ácido tánico (Sigma-Aldrich) en un rango de 0,02 – 0,1 mg/mL y se utilizó para calcular la concentración de taninos en cada una de las muestras. Los resultados fueron expresados en miligramo de ácido tánico sobre gramo de fruto seco (mg ác. tánico/g FW).

#### **4.4.5 Determinación de Vitamina C mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La Vitamina C se determinó mediante el protocolo descrito por United States Pharmacopeia 39 (2016, pp. 440). La técnica empleada fue por HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), para lo cual se utilizó un equipo Agilent Technologies Series 1260, equipado con un detector DAD.

Se pesó 0,255 g de mortiño liofilizado en un balón aforado ámbar de 25 mL y se colocó 10 mL de ácido metafosfórico, se tapó con papel aluminio con el fin de evitar la degradación de la vitamina C. Las muestras fueron colocadas en un baño de ultrasonido en hielo (Fisher Scientific/Ultrasonic batch 5,7L) durante 20 minutos y se agitó el balón cada 5 minutos. Se dejó acondicionar la muestra a temperatura ambiente y se aforó con el diluyente de muestra. Después de aforar las muestras se filtró con ayuda de un filtro jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  y se colocó en viales de HPLC.

Las condiciones con las que se analizó las muestras fueron:

- Flujo: 1,0 mL/min
- Volumen de Inyección: 20  $\mu$ L
- Temperatura: ambiente
- Longitud de onda: 245 nm
- Tiempo de corrida: 20 minutos
- Columna: Eclipse Plus C18 (5  $\mu$ m 4,6 x 150 mm)
- Fase móvil: Sol. Fosfato diácido de Potasio 50 mM pH 2,5 : Metanol (98,2)
- Modo de elución: Dinámico (Mezcla de dos líneas)

Para la cuantificación de las muestras, se realizó una curva de calibración utilizando el estándar de Ácido ascórbico (Chem Service, Pureza 99,5 % y Humedad 0 %) en un rango de concentración de 5 – 50 mg/L. Los resultados obtenidos fueron expresados en miligramo sobre 100 gramo de fruto seco (mg/100 g).

#### **4.4.6 Determinación de $\beta$ -Caroteno mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

El  $\beta$ -Caroteno se determinó mediante el protocolo descrito por Hernández y colaboradores (2011). La técnica empleada fue por HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), para lo cual se utilizó un equipo Agilent Technologies Series 1260, equipado con un detector DAD.

Se pesó 5 g de mortiño liofilizado en un frasco de 250 mL y se añadió 100 mL de cloroformo. Estas muestras fueron colocadas en la oscuridad durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se filtraron usando papel filtro y se evaporó el cloroformo. Después se pesó 3 g de fruto seco y se colocó en un balón de destilación de 250 mL y se añadió 100 mL de hidróxido de potasio metanólico

al 5 %. Estos balones fueron colocados mediante vía reflujo para realizar el proceso de saponificación durante 4 horas a 50 °C.

Después de este proceso los balones se enfriaron y se adicionó 100 mL de éter de petróleo. Se colocó en un embudo de separación donde se añadió 100 mL de agua tipo I. Se dejaron reposar los balones y se recogió la fase orgánica (fase superior).

La fase orgánica se colocó en un balón de destilación y se concentró en el rotavapor a 50 °C durante 15 minutos. Se adicionaron 20 mL de fase móvil de isopropanol: metanol (proporción 65:35). Las muestras fueron filtradas con un filtro jeringa de 0,45 µm y se colocaron en viales de HPLC.

Las condiciones con las que se analizó las muestras fueron:

- Flujo: 1,0 mL/min
- Volumen de Inyección: 20 µL
- Temperatura: ambiente
- Longitud de onda: 450 nm
- Tiempo de corrida: 15 minutos
- Columna: Eclipse Plus C18 (5 µm 4,6 x 250 mm)
- Fase móvil: Isopropanol : Metanol (65:35)
- Modo de elución: Dinámico (Mezcla de dos líneas)

Para la cuantificación de las muestras obtenidas, se realizó una curva de calibración utilizando el estándar de β-Caroteno (Sigma-Aldrich, Pureza 93 % y Humedad 0 %) en un rango de concentración de 0,05 – 10 mg/L. Los resultados obtenidos fueron expresados en microgramo sobre 100 gramos de fruto seco (µg/100 g).

#### **4.5 Aislamiento y purificación de la fracción polifenólica**



Se determinó mediante el método descrito por Giampieri y colaboradores (2014, pp. 1939-1948). El método consiste en realizar una extracción en fase sólida en columna de Amberlita X-20.

Primero se acondicionó la columna de Amberlita (Supelco) con las siguientes soluciones: 2 L de NaOH 0,1 M, 2 L de HCl 0,1 M y 2 L de ácido fórmico/agua (proporción 99:1, V/V) durante 20 minutos cada solución.

Después de este proceso se pesó 20 g de muestra liofilizada de mortiño y se colocó en una solución compuesta por metanol/ácido fórmico (proporción 1:3, v/v). La muestra pasó por un baño de ultrasonido durante 1 hora y se filtró. El filtrado se colocó en un balón de destilación y se secó en el rotavapor a 45 °C. El residuo seco fue resuspendido en agua/ácido fórmico (proporción 99:1 v/v). La solución pasó a través de la columna de Amberlita, que después fue lavada con agua destilada tres veces. La fracción rica en polienoles fue obtenida mediante una elución del contenido retenido en la columna con metanol/ácido fórmico (proporción 99:1 v/v). El contenido de polifenoles conseguido pasó por el rotavapor para eliminar el solvente y el residuo resultante de este proceso se almacenó a -20 °C.

#### **4.6 Identificación de compuestos polifenólicos mediante HPLC acoplado a espectrofotometría de masas**

La identificación se realizó mediante el procedimiento descrito por Giampieri y colaboradores (2014, pp. 1939-1948). Para el cual se utilizó el extracto rico en polifenoles descrito en el punto 4.5. El análisis de HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) fue llevada a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector DAD enlazado a un procesador de datos HP Chem Station (rev. A.05.04). El espectrómetro de masas (MS) posee una fuente ESI y un analizador de masas

con triple cuádruplo de iones, el cual fue controlado por el software Anlyst 5.1. Los compuestos fueron identificados mediante su tiempo de retención, espectros UV-vis y espectros de masas, que fueron comparados con la biblioteca de datos y estándares.

#### 4.6.1 Análisis de antocianinas

La columna utilizada fue de C18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4,6 mm) a 35 °C. Los solventes empleados fueron ácido tri-fluoroacético 0,1 % y acetonitrilo. Los gradientes de elución utilizados se describen en la *Tabla 2*.

Tabla 2.

*Gradientes de elución empelados en la identificación de antocianinas en HPLC/MS.*

Elución	Tiempo (minutos)
Isocrático 10 %	3
Isocrático 10-15 %	12
Isocrático 15 %	5
Isocrático 15-18 %	20
Isocrático 30-35 %	5

La velocidad de flujo empleada fue de 0.5 mL/min. La detección en línea fue llevada a cabo en el DAD a longitudes de onda de 280 y 520 nm y en el MS fue operado en el modo de ion positivo. Los espectros fueron identificados entre m/z 100 y m/z 1500 de peso molecular. Los parámetros de escaneo completo de alta sensibilidad (EMS) fueron ion spray con un voltaje de 5000 V, potencial de desconexión (DP) con 41 V, entrada potencial (EP) a 7.5 V y energía de colisión (CE) a 10 V. Para el análisis del ion de producto mejorado (EPI) se aplicaron los siguientes parámetros 41 V para DP, 7.5 V en EP, 10 V en CE y 0 V en la propagación de energía de colisión.

#### 4.6.2 Análisis de flavonoides y otros derivados fenólicos

La columna utilizada fue Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 4,6 mm) a 35 °C. Los solventes empleados fueron ácido fórmico 0.1 % y acetonitrilo. Los gradientes de elución utilizados se describen en la *Tabla 3*.

Tabla 3.

*Gradientes de elución empelados en la identificación de flavonoides y derivados fenólicos en HPLC/MS.*

Elución	Tiempo (minutos)
Isocrático 15 %	5
Isocrático 15-20 %	5
Isocrático 20-35 %	10
Isocrático 35-50 %	10
Isocrático 50-60 %	5
Isocrático 60%	5

El flujo fue de 0.5 mL/min y la doble detección en línea fue llevada a cabo en DAD a longitudes de onda de 280, 330 y 370 nm, y el MS fue operado en el modo ion negativo. Los espectros fueron identificados entre m/z 100 y m/z 1500 de peso molecular. Los parámetros de EMS fueron 4500 V para el voltaje de pulverización de iones, -50 V para DP, -6 V en EP, -10 V para CR y -3 V en el potencial de salida de celda (CXP). Los parámetros de EPI fueron -50 en DP, -6V para EP, -25 para CE y 0 V para CES.

#### 4.7 Determinación de la capacidad antioxidante en las muestras de mortiño

##### 4.7.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP

Para esta prueba se realizó una dilución 1:10 de los extractos metanólicos de las muestras de mortiño. La capacidad para reducir el hierro se determinó mediante el reactivo de FRAP según el protocolo descrito por Álvarez-Suárez y colaboradores (2010, pp. 9817-9824). Las soluciones para obtener la solución FRAP fueron. (Alvarez-Suarez, González- Paramás, Santos-Buelga, & Battino, 2010)

- Solución Acetato de sodio tri hidratado (Fisher Scientific) ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) 300 mM
- Solución 2.4.6-Tris (2-pyridyl)-s-triazina TPTZ (Sigma-Aldrich) 10 mM
- Solución Cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM
- Solución FRAP se combinó 50 mL de solución acetato de sodio tri hidratado, 5 mL de solución TPTZ y 5 mL de solución citrato férrico (proporción 10:1:1 v/v).

En una placa de 96 pocillos se colocó 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y se añadió 180  $\mu\text{L}$  de la solución de FRAP. El procedimiento fue realizado por triplicado y se generó una muestra blanco donde se colocó 20  $\mu\text{L}$  de agua en reemplazo de la muestra. La absorbancia fue medida a 539 nm en un lector de placas.

La curva de calibrado fue realizada con un estándar de Amonio ferro-sulfato (Loba-Chemie) en un rango de 50 – 500  $\mu\text{M}$ . Los resultados fueron expresados en micromol de Amonio ferro-sulfato sobre gramo de fruto seco ( $\mu\text{mol}$  AFS/g FW).

A su vez se elaboró una curva de calibrado con un estándar de  $\pm$ -6-Hidroxi-2.5.7.8-ácido tetramethylcromano-2-carboxílico (TROLOX) (Sigma-Aldrich) en un rango de 50 – 500  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresaron en micromol de trolox sobre gramo de fruto seco ( $\mu\text{mol}$  Trolox/g FW).

#### 4.7.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH

Para esta prueba se realizó una dilución 1:10 de los extractos metanólicos de las muestras de mortiño. La capacidad para captar los radicales del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se determinó mediante el ensayo que utiliza el reactivo DPPH según el procedimiento descrito por Brand y colaboradores (1995, pp. 25-30).

La solución DPPH 0,2 mM fue preparada disolviendo 0,0395 g de este reactivo en 500 mL de metanol absoluto. Primero se realizó una muestra blanco en la cual se añadieron 110 µL de solución compuesta por etanol/agua (proporción 7:3, v/v), 10 µL de etanol absoluto y 80 µL del reactivo de DPPH. Para la muestra se colocó 110 µL de etanol/agua (proporción 7:3, v/v), 10 µL de la muestra y 80 µL del reactivo de DPPH. Este procedimiento se realizó por triplicado y la placa fue incubada a temperatura ambiente en la oscuridad por 15 minutos. La absorbancia de las muestras fue medida a 517 nm en un lector de placas. El porcentaje de actividad de DPPH se calculó empleando la Ecuación 2.

$$\% \text{ Actividad DPPH} = \left( \frac{\text{Abs muestra} - \text{Blanco}}{\text{Blanco}} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

La curva de calibrado fue realizada con estándar de TROLOX en un rango de 5-500 µM. Los resultados se expresaron en micromol de trolox sobre gramo de fruto seco (µmol Trolox/g FW).

#### 4.8 Evaluación Estadística de los Resultados

El análisis estadístico se realizó empleando el software STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EE. UU.). Los datos entre los diferentes grupos fueron analizados mediante ANOVA de un factor y prueba Turkey. Se consideró

$P < 0.05$  como significativo. Los análisis se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  SD.

## 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Composición química del mortiño

Los resultados de la composición química del mortiño se muestran en la *Tabla 4*, donde se observa cada uno de los parámetros analizados.

Tabla 4.

*Resultados de la caracterización química de las muestras de mortiño. Se indica la valoración estadística realizada (ANOVA y Prueba Tukey).*

Localización			
Parámetro	Ambato	Pichincha	Cotopaxi
Fenoles Totales (mg GAE/g FW)	5,98 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	8,23 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	5,97 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
Flavonoides (mg Cat/g FW)	13,74 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	16,11 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	14,88 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
Antocianinas (mg PgEq/g FW)	1,69 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	2,87 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,26 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
Taninos (mg ác tánico/g FW)	4,03 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	5,68 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	2,87 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
$\beta$ -Caroteno ( $\mu$ g/100 g)	46,34 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	81,38 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>	42,80 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Vitamina C (mg/100 g)	59,61 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	43,09 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	35,14 $\pm$ 0,68 <sup>c</sup>

Los resultados de fenoles totales, flavonoides y antocianinas indican que el mortiño Pichincha (MtP) posee diferencias significativas en comparación con las muestras de mortiño Ambato (MtA) y mortiño Cotopaxi (MtC), siendo MtP el

que presentó mayor concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas mientras que MtA y MtC presentaron concentraciones en un mismo rango. Los resultados del análisis de polifenoles totales en los frutos de mortiño provenientes de las tres regiones del Ecuador indicaron una concentración de 5,97 a 8,23 mg GAE/g FW. Estos resultados coinciden con los datos reportados en mortiño del género *Vaccinium meridionale* SW proveniente de Colombia donde reportaron concentraciones de 5.19 a 6.02 mg GAE/g FW (Andrade-Cuvi, Moreno, Zaro, Vicente, & Concellón, 2017, pp. 1–10; Gaviria et al., 2009, pp. 519–258). A su vez estos resultados indican que el mortiño está dentro de los rangos reportados para frutos rojos ya que en blueberries se encontró concentraciones de polifenoles de 2,5 a 7 mg GAE/g FW (Dongnan et al., 2017, pp. 84–93). Por otro lado, los estudios realizados en Mahonia berries de Malasia reportaron una concentración de 10,08 mg GAE/g FW (Coklar & Akbulut, 2017, pp. 166–174).

Los resultados del análisis de flavonoides en los frutos de mortiño provenientes de las tres regiones del Ecuador se encontraron dentro del rango de 13,74 a 16,11 mg CAT/g FW. Esto indica que el mortiño *Vaccinium floribundum* Kunth tienen una concentración superior de flavonoides comparada con otros frutos rojos. Estudios realizados en fresa procedente de Ancona, Italia se reportó una concentración máxima de 7,49 mg CAT/g FW (Giampieri, Alvarez-Suarez, Mazzoni, et al., 2014, pp. 1939–1948). En la frambuesa procedente de Holanda los estudios reportaron el rango máximo de flavonoides es 0,25 a 0,41 mg CAT/g FW (Sariburun, Sahin, Demir, Turkben, & Uylaser, 2010, pp. 328–335). Estudios realizados en varios cultivos de blueberries provenientes de varias regiones de Europa indicaron que la concentración máxima de flavonoides fue de 1.62 mg CE/g FW (Dongnan et al., 2017, pp. 84–93).

Los resultados del análisis de antocianinas monoméricas en los frutos de mortiño procedentes de las tres regiones del Ecuador se encontraron en el

rango de 1,26 a 2,87 mg PgEq/g FW. Estos resultados se encuentran dentro de los reportados en mortiño del género *Vaccinium meridionale* SW proveniente de Colombia, donde la concentración de antocianinas fue de 2 Pg/g FW (Gaviria et al., 2009, pp. 519–528). por otro lado, Andrade-Cuvi y colaboradores (2017, pp. 1-10) reportaron en mortiño del género *Vaccinium meridionale* SW proveniente de la parte sur de Colombia, una concentración de antocianinas de 0,95 a 3 mg Pg/g FW. Estudios realizados en Mahonia berries indicaron que la máxima concentración de antocianinas en este fruto es de 3,52 mg Pg/g FW (Coklar & Akbulut, 2017, pp. 166–174).

Los resultados en el análisis del contenido total de Taninos muestran que existen diferencias significativas entre los frutos de mortiño siendo MtP la que presentó una mayor concentración, seguido de MtA con una concentración intermedia y MtC con una menor concentración. La concentración de taninos obtenida en mortiño fue de 2,87 a 5,68 mg ac tánico/g FW. Para este estudio se utilizó un estándar de ácido tánico sin embargo no se pudo realizar una comparación debido a que existen pocos o ningún resultado expresado con el mismo estándar. Estos resultados coinciden con los reportados en frutos rojos con otros estándares como es el caso de los cultivos de uvas para la obtención de vino donde la concentración de taninos fue de 0,2339 a 1,5687 g/L CE de catequina (Zhang et al., 2017, pp. 811–817). Por otra parte da Silva y colaboradores (2017, pp. 292-298) realizaron estudios en brazilian berrie donde demostraron que la concentración de taninos en esta fruta fue de 4,75 mg/L CE de catequina.

Los resultados del análisis de  $\beta$ -Caroteno por HPLC indican que MtP posee diferencias significativas en comparación con MtA y MtC, siendo MtP el que presentó mayor concentración mientras que MtA y MtC presentaron concentraciones en un mismo rango. La concentración de  $\beta$ -Caroteno en mortiño fue de 42,80 a 81,38  $\mu$ g/100 g, estos resultados se encuentran dentro



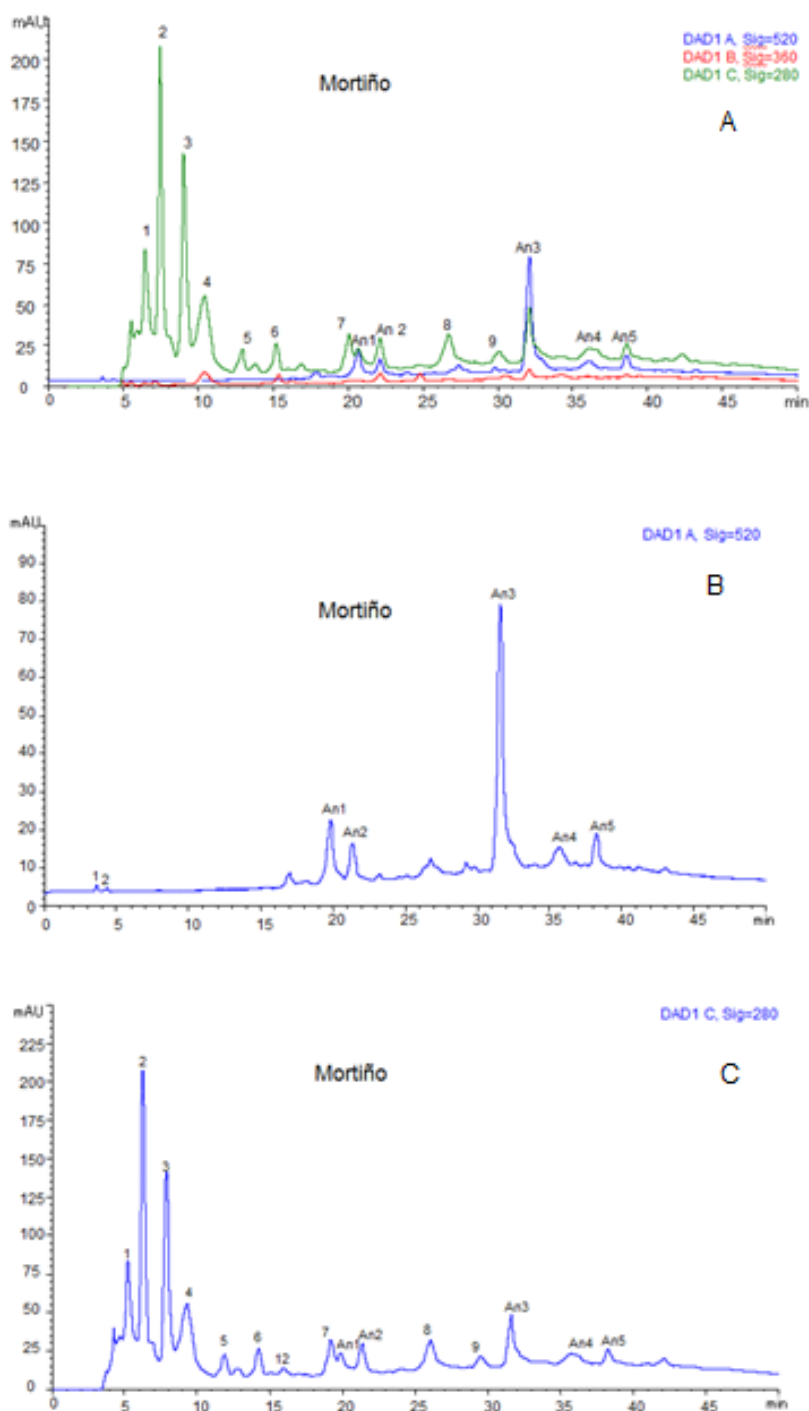
de los rangos reportados en mortiño *Vaccinium floribundum* Kunth proveniente de Ecuador. Vasco y colaboradores (2009, pp. 8274-8281) demostraron que en el mortiño de este género la concentración de  $\beta$ -caroteno es de 36  $\mu\text{g}/100\text{gFW}$ . Adicionalmente Tupuna y colaboradores (2016, pp. 1-11) reportaron que el contenido de carotenoides en mortiño del mismo género es de 130  $\mu\text{g}/100\text{gFW}$ .

El análisis de la Vitamina C por HPLC demostraron que existen diferencias significativas en los frutos de mortiño siendo MtA el que presentó mayor concentración, seguido de MtP con una concentración intermedia y MtC con una menor concentración. La concentración de Vitamina C en mortiño fue de 35,14 a 59,61 mg/100 g. Estos resultados se encuentran dentro de los rangos reportados en mortiño *Vaccinium floribundum* Kunth por Coba y colaboradores (2012, pp. 5-13) que encontraron concentraciones de 101 mg/100 g.

Esta variación puede estar relacionada a la situación geográfica, tipo de suelo, forma de cultivo, tiempo de cosecha o condiciones climáticas, que influyen en la composición química del mortiño *Vaccinium floribundum* Kunth (Vasco et al., 2009, pp. 8274–8281).

## **5.2 Cuantificación de polifenoles totales en mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrofotómetro de masas (HPLC/MS)**

En la *Figura 13* se reportan los cromatogramas obtenidos por el análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrofotómetro de masas (HPLC/MS) los cuales permitieron identificar los polifenoles totales en mortiño como se resumen en la *Tabla 5*.



*Figura 14.* Resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles totales.

- Resumen de cromatogramas obtenidos en análisis de HPLC para la identificación de polifenoles totales en la muestra de mortiño.
- Cromatograma obtenido por análisis de HPLC a 520 nm para identificación de antocianinas presentes en mortiño.
- Cromatograma obtenido por análisis de HPLC a 280 nm para identificación de flavonoides presentes en mortiño.

Tabla 5.

*Identificación tentativa de compuestos polifenólicos totales en mortiño (Vaccinium floribundum Kunth). An1-An5 representa las antocianinas identificadas, mientras que 1-9 representa a los flavonoides y polifenoles identificados.*

Número de pico	T <sub>R</sub> (min)	DAD (nm)	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	Identificación tentativa
An1	19.9	280; 518	449	287	Cyanidin hexoside
An2	21.4	282; 320; 520	611	449; 287	Cyanidin-cafeoyl-glucoside
An3	31.6	276; 532	697	287	Cyanidin di-acetylglucoside
An4	35.7	276; 532			Derivados cyanidin
An5	38.3	276; 532		287	Cyanidin aglycon
1	6.3	284			Derivados Ácido hidroxibenzoico
2	7.9	260; 294	155	123	Ácido protacatéquico
3	9.3	284; 316	343 197 137		Derivado de ácido cafeico
4	11.9	256	327	285; 133	
5	12.8	274	215	155	Derivado Ácido dihidroxibenzoico
6	16	280	595		Dímero GC-epi (catechin)
7	19.2	290	369	193	Feruloilquínico
8	26.1	230; 274			
9	29.5	274; 300	295	179; 157	Derivado Ácido hidroxicinámico

**Nota:** T<sub>R</sub>: Tiempo de retención. DAD: Detector de arreglo de Diodos, absorbancia cuantificado en nanómetros. MS: Espectro de masas 1 expresado en unidades de masa/carga. MS/MS: Espectro de masas 2 expresado en unidades de masa/carga

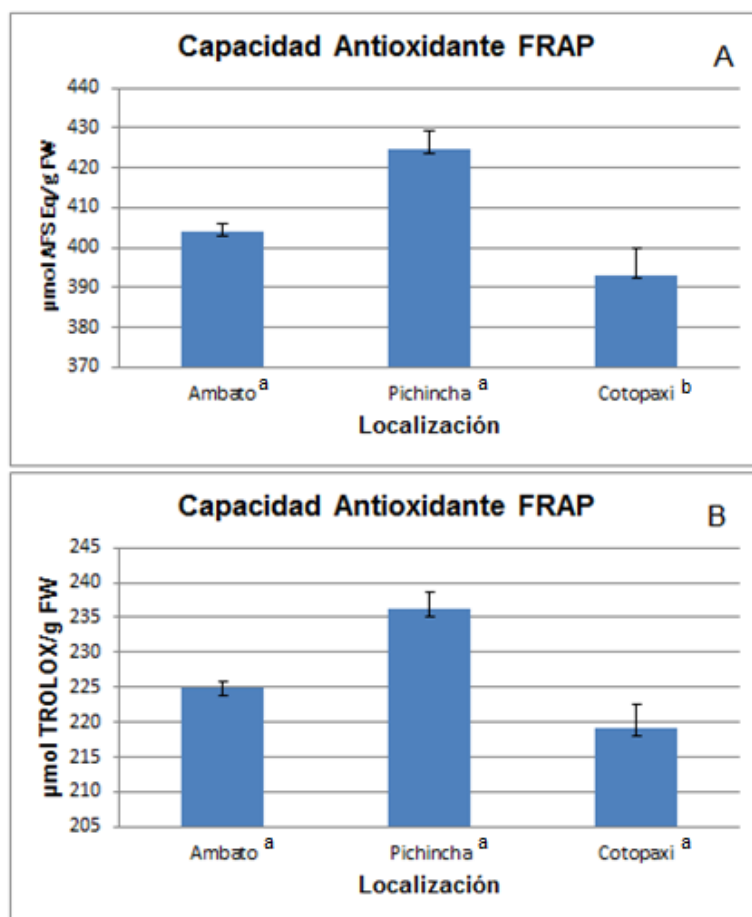
En la *Tabla 5* se resume los 14 compuestos polifenólicos identificados en el espectrofotómetro de masas (MS) a partir de los cromatogramas obtenidos en HPLC. Estos resultados evidencian la presencia de antocianinas cianidin hexoside, cianidin pentoside, cianidin aglycon y delphonidin hexoside. Los cuales han sido reportados en mortiño del género *Vaccinium floribundum* Kunth proveniente del Ecuador y se encuentran en mayor proporción en la cáscara del fruto (Schreckinger, Wang, Yousef, Lila, & Gonzalez, 2010, pp. 8966–8976; Vasco et al., 2009, pp. 8274–8281;). Por otro lado, se identificó Dímero GC-epi catechin que indica la presencia de derivados de taninos o proantocianidinas (Tian et al., 2017, pp. 266–281). Schreckinger y colaboradores (2010, pp. 8966-8975) identificaron que *Vaccinium floribundum* Kunth posee derivados proantocianidinas los cuales van desde dímeros a hexámeros y junto con las antocianinas se encargan de dar el color vino característico del mortiño (Vasco et al., 2009, pp. 8274–8281).

A su vez se identificaron compuestos polifenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico, que se encuentran dentro de los reportados en mortiño del género *Vaccinium floribundum* Kunth; sin embargo hay que afirmar que existe mayor presencia de flavonoles y no solo los derivados del ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxinámico (Vasco et al., 2009, pp. 8274–8281). Esta variación puede deberse al tipo de extracción realizada (Coklar & Akbulut, 2017, pp. 166–174; Wang et al., 2015, pp. 295–281).

La variación en la identificación de los compuestos polifenólicos en mortiño también se ve influenciada por factores como condiciones climáticas, situación geográfica, acceso de nutrientes, tiempo de cosecha, tiempo de post cosecha, acceso a la luz, entre otros (Vasco et al., 2009, pp. 8274–8281; Wang et al., 2015, pp. 295–304).

### 5.3 Capacidad antioxidante del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) mediante los métodos de FRAP y DPPH

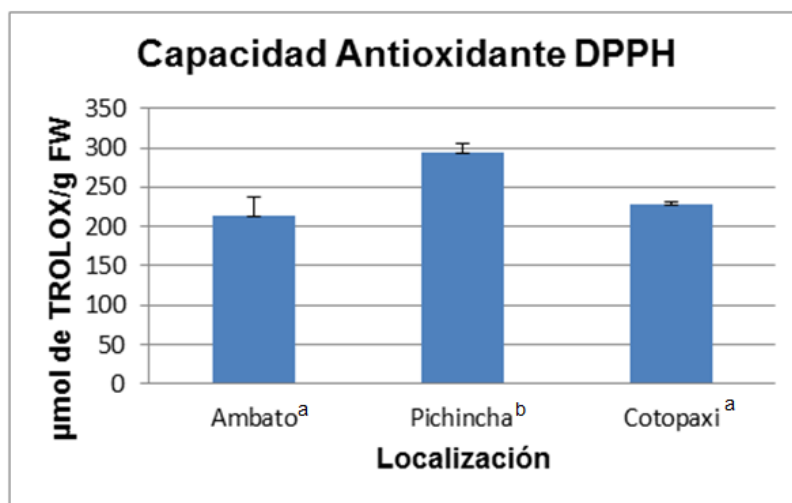
La capacidad antioxidante por el método de FRAP en mortiño proveniente de los tres páramos del Ecuador se muestra en la *Figura 14*. Los resultados se expresaron con dos estándares: estándar de amonio ferro sulfato ( $\mu\text{mol AFS/g FW}$ ) (*Figura 14 A*) y estándar de TROLOX ( $\mu\text{mol de TROLOX/g FW}$ ) (*Figura 14 B*).



*Figura 15.* Resultados de la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP.

- Resultados de la capacidad antioxidante de mortiño de los tres páramos del Ecuador expresados en micromol de amonio ferro sulfato por gramo de fruto fresco ( $\mu\text{mol AFS Eq/g FW}$ ).
- Resultados de la capacidad antioxidante de mortiño proveniente de los tres páramos del Ecuador expresados en micromol de TROLOX por gramo de fruto fresco ( $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$ ).

La capacidad antioxidante por el método de DPPH en mortiño proveniente de los tres páramos de Ecuador se muestra en la *Figura 15*.



*Figura 16.* Resultados de la capacidad antioxidante de mortiño de los tres páramos del Ecuador expresados en micromol de TROLOX por gramo de fruto fresco ( $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$ ).

Los resultados obtenidos reportan que la capacidad antioxidante tanto con el método de FRAP como DPPH muestran diferencias significativas entre las tres muestras del mortiño, siendo MtP el que presentó mayor capacidad antioxidante, seguido de MtA y por último MtC.

Tanto el método de FRAP como DPPH permiten demostrar la capacidad antioxidante en muestras de plantas (Alothman, Bhat, & Karim, 2009, pp. 785–788). El método de FRAP se encarga de evaluar la capacidad antioxidante mediante una reacción de óxido reducción, es decir el compuesto polifenolico permite reducir el  $\text{Fe}^3$  a  $\text{Fe}^2$  (Cuellar, Ariza, Anzola, & Restrepo, 2013, pp. 21–28). Los resultados obtenidos en frutos de mortiño mediante el método de FRAP con el estándar de amonio ferro sulfato fueron de 393,13 a 424,79 AFS/g FW, los cuales son altos en comparación con los datos reportados en frutos rojos, como el caso de blueberries donde indicaron que la capacidad antioxidante fue de 139 mg AFS/g FW (Wang et al., 2015, pp. 295–304).

Por otro lado los resultados en frutos de mortiño mediante el método de FRAP con el estándar de TROLOX fueron de 219,13 a 236,02 mg TROLOX/g FW. Estos son altos en comparación con los datos reportados en frutos rojos, como el caso de frutos rojos procedentes de Brasil donde la capacidad antioxidante fue de 25 a 36 mg TROLOX/g FW (Flanigan & Niemeyer, 2014, pp. 518–526). Esta variación en la capacidad antioxidante se encuentra relacionada con la concentración de polifenoles presentes en la muestra (Castro-López et al., 2017, pp. 1139–1148).

El método DPPH trata de la capacidad que tiene este radical de interactuar con el compuesto antioxidante, siendo los polifenoles los que ceden un átomo de hidrógeno y el radical DPPH queda neutralizado (Guija-Poma, Inocente-Camones, Ponce-Prado, & Zarzona-Norabuena, 2015, pp. 57–60). Los resultados en frutos de mortiño mediante el método de DPPH indicaron un rango de 213,36 a 293,51 mg TROLOX/g FW, estos valores son altos ya que en blueberries del género *Vaccinium corymbosum* L la capacidad antioxidante de este fruto por DPPH fue de 79,42 mg TROLOX/g FW (Cardeñosa, Girones-Vilaplana, Muriel, Moreno, & Moreno-Rojas, 2016, pp. 276–283). Adicionalmente, estudios realizados en varios cultivos de blueberries reportaron que la capacidad antioxidante fue de 45 a 76 mg TROLOX/g FW (Dongnan et al., 2017, pp. 84–93; Wang et al., 2015, pp. 295–304).

Al comparar los resultados de FRAP y DPPH en valores de  $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$  se evidencia que la capacidad antioxidante del mortiño proveniente de distintos páramos del Ecuador se encuentran dentro de un mismo rango (219,13 – 236,02  $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$  en FRAP y 213,36 – 293,51  $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$  en DPPH). Esto evidencia que los métodos de FRAP y DPPH poseen una misma tendencia y que la capacidad antioxidante se encuentra relacionada con el contenido de polifenoles totales presentes en las frutas (Allothman et al., 2009, pp. 785–788; Castro-López et al., 2017, pp. 1139–1148;

Dongnan et al., 2017, pp. 84–93). Sin embargo esta capacidad puede variar dependiendo de las condiciones ambientales ya que modifican la composición química de las frutas (Cardeñosa et al., 2016, pp. 276–283).



## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

La caracterización química indicó que el mortiño Pichincha presentó mayor concentración de polifenoles totales, la cual fue de 8,23 mg GAE/g FW en comparación con las otras muestras de mortiño provenientes de Ambato y Cotopaxi. Esto indica que la composición química de la fruta depende del lugar donde proviene debido a factores que pueden influenciar en la concentración de compuestos bioactivos.

La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrómetro de masas permitió identificar 14 compuestos polifenólicos presentes en mortiño los cuales son antocianinas: cyanidin hexoside, cyanidin pentoside, cianidin aglycon, delphonidin hexoside. Proantocianinos o taninos: Dímero GC-epicatechin y flavonoides: derivados del ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico.

La capacidad antioxidante del mortiño Pichincha con el reactivo de FRAP y DPPH fueron los más altos con valores de 236,02  $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$  para FRAP y 293,51  $\mu\text{mol TROLOX/g FW}$  en DPPH, valores no reportados anteriormente por bibliografía en frutos rojos.

La capacidad antioxidante del mortiño indicó que se encuentra relacionado con su composición química. A mayor concentración de polifenoles posee una mejor capacidad antioxidante

## 6.2. Recomendaciones

Realizar un estudio comparativo de la caracterización química del mortiño estudiando factores como tiempo de cosecha y post cosecha y como estos puede influenciar en la concentración de compuestos bioactivos.

Realizar un estudio de la capacidad antioxidante del mortiño a nivel celular, analizando como los compuestos bioactivos estimulan la ruta metabólica implicada en la respuesta antioxidante AMPK/Nrf2, evaluando los niveles de expresión génica de esta ruta ante la presencia de un agente oxidante.

## REFERENCIAS

- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). *Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents*. *Food Chemistry*, 115, 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Cordero, M., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T.Y., Mazzoni, L., Afrin, S., Beltrán-Ayala, P., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Varela-Lopez, A., Quiles, J.L. & Battino, M. (2016). *Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblast against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.05.008>
- Alvarez-Suarez, J. M., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., & Battino, M. (2010). *Antioxidant characterization of native monofloral Cuban honeys*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9817–9824. <https://doi.org/10.1021/jf1018164>
- Andrade-Cuvi, M. J., Moreno, C., Zaro, M. J., Vicente, A. R., & Concellón, A. (2017). *Improvement of the Antioxidant Properties and Postharvest Life of Three Exotic Andean Fruits by UV-C Treatment*. *Journal of Food Quality*, 17, 1–10. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2017/4278795>
- Batista, Á., da Silva, J., Betim-Cazarin, C., Telles-Biasoto, A., Frankland Sawaya, A., Prado, M. & Maróstica, M. (2017). *Red-jambo (Syzygium malaccense): Bioactive compounds in fruits and leaves*. *LWT-Food Science and Technology*, 26, 284-291
- Beserra, M., Machado, P., Campos, Á., Matias do Prado, G., de Carvalho, C.,

- Arraes, G., & Gomes, T. (2011). *Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Food Research International*, 44, 2155–2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>
- Brand, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Cabral, A., Oliveira, D., Barros, I., Alexandre, C., José, E., Bechara, H., Goulart, F. (2009). *Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. Food Chemistry*, 115, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.045>
- Calvopiña, J., Factos, M., Mejía, L., Aguilar, C., Quishpe, M., Aguirre, J., Factos, A. (2008). Elaboración del plan de manejo de la reserva Ecológica Illinizas (REI). Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://suia.ambiente.gob.ec/documents/10179/242256/30+PLAN+DE+MANEJO+ILINIZAS.pdf/a4b31f30-95a5-43e9-8875-c51258f08b4d>
- Cândido, T. L. N., Silva, M. R., & Agostini-Costa, T. S. (2015). *Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (Mauritia flexuosa L .f.) from the Cerrado and Amazon biomes. Food Chemistry*, 177, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.041>
- Cardeñosa, V., Girones-Vilaplana, A., Muriel, J. L., Moreno, D. A., & Moreno-Rojas, J. M. (2016). *Influence of genotype , cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (Vaccinium corymbosum L.). Food Chemistry*, 202, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.118>

- Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2017). *Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts*. *Food Chemistry*, 237, 1139–1148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). *Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Charco, J. (2015). *Experiencias de desarrollo local en la unión de organizaciones y pueblo Chibuleo "UNOPUCH", período 2000 a 2012, Cantón Ambato provincia de Tungurahua*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). *Estudio etnobotánico del Mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funciona*. *La Granja*, 5–13.
- Cobo, M., Gutiérrez, B., Torres, A., & Torres, M. de L. (2016). *Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)*, 64, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.11.008>
- Coklar, H., & Akbulut, M. (2017). *Anthocyanins and phenolic compounds of *Mahonia aquifolium* berries and their contributions to antioxidant activity*. *Journal of Functional Foods*, 35, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.037>
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). *Antioxidant capacity , phenolic content and*

*vitamin C in pulp , peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Research International, 44, 2047–2053. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>*

Cuellar, F., Ariza, E., Anzola, C., & Restrepo, P. (2013). Capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante la maduración. *Revista Colombiana de Química, 42*(2), 21–28.

da Silva, J., Batista, Á., Betim, C., Dionísio A. P., de Brito, E., Biasoto, A., & Maróstica, M. (2017). *Functional tea from Brazilian Berry: Overview of the bioactives compounds. LWT-Food Science and Technology, 76, 292-298. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.016>*

Diamanti, J., Mezzetti, B., Giampieri, F., Alvarez-suarez, J. M., Quiles, J. L., Gonzalez-alonso, A., Gonza, A. M. (2014). *Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in Rats Is Efficiently Counteracted by Dietary Anthocyanin Differently Enriched Strawberry (Fragaria x ananassa Duch.). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 62, 3935–3943.*

Dongnan, L., Bin, L., Yan, M., Xiyun, S., Yang, L., & Xianjun, M. (2017). *Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. Journal of Food Composition and Analysis, 62, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.006>*

Dwyer, J., & Erdman, J. (2015). *Understanding Flavonoids and Their Role in Health*. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://ilsi.org/event/understanding-flavonoids-their-role-in-health/>

Fallarero, A. (2005). Actividad antioxidante y neuroprotectora in vitro del extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetrum* (Ceramiales, Rhodomelaceae). Universidad de La Habana.

- Fine, A. (2000). *Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications*. *Alternative Medicine Review*, 5(2), 144–151.
- Flanigan, P. M., & Niemeyer, E. D. (2014). *Effect of cultivar on phenolic levels , anthocyanin composition , and antioxidant properties in purple basil (Ocimum basilicum L.)*. *FOOD CHEMISTRY*, 164, 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.061>
- Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Gasparri, M., Mazzoni, L., Quiles, J. L., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). *The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms*. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 154–182. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.017>
- Gallardo de la Puente, C. (2015). *MORTIÑO La Perla de Los Andes*. Quito: Universidad de las Américas.
- Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., Rojano, B. (2009). *Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation of mortiño fruits extracts (Vaccinium meridionale SW)*. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(6), 519–528.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J., & Battino, M. (2014). *Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity*. *Agricultural And Food Chemistry*, (January 2014), 3867–3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Cordero, M. D., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Afrin, S., Battino, M. (2017). *Strawberry*

*consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. Food Chemistry, 234, 464–471.*  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.017>

Giampieri F., Alvarez-Suarez, J.M., Gasparriani, M., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Bompadre, S., Battino, M. (2016) *Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. Food and Chemical Toxicology, 94, 128-137.*  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.003>

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparriani, M., González-Paramàs, A. M., Battino, M. (2014). *An anthocyanin-rich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent. Food & Function, 5(8), 1939–1948.* <https://doi.org/10.1039/C4FO00048J>

Gobierno Provincial de Tungurahua. (2015). Estudio del Estado Actual del Ecosistema Páramo en Tungurahua. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de [rnn.tungurahua.gob.ec/documentos/download/56cc8cc283ba883024c8c031](http://rnn.tungurahua.gob.ec/documentos/download/56cc8cc283ba883024c8c031)

Guacho, D. (2013). Estudio de la Medicina Tradicional como Potencial Atractivo Turístico en el Cantón Cuenca. UNIVERSIDAD DE CUENCA.

Gualavisí, L. (2008). Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el conconetrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del Ministerio de Salud Pública. Universidad San Francisco de Quito.



- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Prado, J., & Zarzona-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Revista Médica Horizonte*, 2(1), 57–60.
- Hernández, T., Aldana, M., & Rodríguez, L. (2011). Validación de un método para la determinación de beta-caroteno en aceite de palma por HPLC con detector UV. Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Jácome, F. (2009). Guía Interpretativa del Parque Nacional Cotopaxi. Retrieved recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://www.ambiente.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2012/07/Parque-Nacional-Cotopaxi.pdf>
- Korc, I., Bidegain, M., & Martell, M. (1995). Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *Revista Médica Uruguay*, 2, 121–135.
- Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Caballos, G., & Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica UV*, 10(2), 32–39.
- Mattera, R., Benvenuto, M., Giganti, M. G., Tresoldi, I., Pluchinotta, F. R., Bergante, S., Bei, R. (2017). *Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes*. *Nutrients*, 1–43. <https://doi.org/10.3390/nu9050523>
- Ministerio de Ambiente del Ecuador. (2010). Plan de Manejo Parque Nacional Cotopaxi Capítulo IV Síntesis operativa del área protegida y su entorno. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://suia.ambiente.gob.ec/documents/10179/242256/31+PLAN+DE+MANEJO+COTOPAXI+4.pdf/1eae2834-3ad4-4648-9255->

4fa0563f3b86

Ministerio de Ambiente del Ecuador. (2012). Resolución No. 66 (Creación de la reserva ecológica Los Illinizas. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://suia.ambiente.gob.ec./documents/10179/241417/30+RESERVA+ECOLOGICA+LOS+ILINIZAS.pdf/769909b7-f643-402d-8d8b-1af5d6a5baab>

Moscoso, L. (2013). Medicina Ancestral Saberes para curar el cuerpo y alma. Recuperado el 20 de Octubre del 2017 de: [http://www.patrimonio.quito.gob.ec/images/libros/2014/Medicina\\_Ancestral.pdf](http://www.patrimonio.quito.gob.ec/images/libros/2014/Medicina_Ancestral.pdf)

Norma ISO 9648. (1988). Norma Internacional para la Determinación de Taninos.

Obrocki, L., & Goerres, M. (2012). Georeferenciación del Páramo de UNOPUCH. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: [rrnn.tungurahua.gob.ec/documentos/download/520dc469ebd424100d000002](http://rrnn.tungurahua.gob.ec/documentos/download/520dc469ebd424100d000002)

OMS. (2002). Medicina Tradicional-Necesidades Crecientes y Potencial. Recuperado el 20 de Noviembre del 2017 de: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2295s/s2295s.pdf>

Quito Adventure. (2016). Parque Nacional Illinizas. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://www.quitoadventure.com/espanol/aventura-ecuador/areas-protegidas-ecuador/andes-ecuador/parque-nacional-ilinizas-01.html>

Rinaldi, A., Iturmendi, N., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., & Moio, L. (2015).

*Transfer of tannin characteristics from grape skins or seeds to wine-like solutions and their impact on potential astringency. LWT-Food Science and Technology*, 63, 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.037>

- Roldán, S. (2012). Caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) de la comunidad Quinticusing del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi. Escuela Politécnica Nacional.
- Romandini, S., Mazzoni, L., Giampieri, F., Tulipani, S., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Alvarez-Suarez, J. M. (2013). *Effects of an acute strawberry (Fragaria x ananassa) consumption on the plasma antioxidant status of healthy subjects. Journal of Berry Research*, 3(3), 169–179. <https://doi.org/10.3233/JBR-130055>
- Sariburun, E., Sahin, S., Demir, C., Turkben, C., & Uylaser, V. (2010). *Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. Journal of Food Science*, 75(4), 328–335. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Scalbert, A., Manach, C., & Jiménez, L. (2005). *Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Schreckinger, M. E., Lotton, J., Lila, M. A., & de Mejia, E. G. (2010). *Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. Journal of Medicinal Food*, 13(2), 233–246. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0233>
- Schreckinger, M., Wang, J., Yousef, G., Lila, M., & Gonzalez, E. (2010).

*Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of Vaccinium floribundum and Aristotelia chilensis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 8966–8976. <https://doi.org/10.1021/jf100975m>*

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299(1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)*

Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador. (2015a). Parque Nacional Cotopaxi. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/parque-nacional-cotopaxi>

Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador. (2015b). Reserva Ecológica de los Illinizas. Recuperado el 1 de Noviembre del 2017 de: <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/reserva-ecológica-illinizas>

Su, Z. (2012). *Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L. SFA ScholarWorks, 3, 7–37.*

Thompson, K., Pederick, W., & Santhakumar, A. B. (2016). *Anthocyanins in obesity-associated thrombogenesis: a review of the potential mechanism of action. Food Funct., 7(5), 2169–2178. <https://doi.org/10.1039/C6FO00154H>*

Thompson, K., Pederick, W., Singh, I., & Santhakumar, A. B. (2017). *Anthocyanin supplementation in alleviating thrombogenesis in overweight and obese population: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Journal of Functional Foods, 32, 131–138.*

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.031>

- Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., Yang, B. (2017). *Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. Food Chemistry, 220*, 266–281. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.145>
- Torres, M., Trujillo, D., & Arahana, V. (2010). Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Avances en Ciencias e Ingenierías, 2*, 9–15.
- Tulipani, S., Armeni, T., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gonzalez-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Battino, M. (2014). *Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. Food Chemistry, 156*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.098>
- Tupuna, S., Vera, E., & Ruales, J. (2016). Obtención de Jugo Clarificado Concentrado de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) Mediante el Uso de Tecnología de Membranas. *Revista Politécnica EPN, 38*(1).
- United States Pharmacopeia 39. (2015). *Capítulos Generales, Pruebas y Valoraciones*. (T. Parkway, Ed.). Rockville.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). *Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (Vaccinium floribundum kunth). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar, 31*(2), 126–133.

- Villalta, R. (2016). Estudio del efecto de quemas recientes sobre el microclima del suelo en el Páramo de la La Reserva Ecológica Los Illinizas. Universidad Politécnica Salesiana.
- Wang, L., Wu, J., Wang, H., & Li, S. (2015). *Composition of phenolic compounds and antioxidant activity in the leaves of blueberry cultivars. Journal of Functional Foods, 16, 295–304.* <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.027>
- Zhang, N., Liu, X., Jin, X., Li, C., Wu, X., Yang, S., Yanne, P. (2017). *Determination of total iron-reactive phenolics, anthocyanins and tannins in wine grapes of skins and seeds based on near-infrared hyperspectral imaging. Food Chemistry, 237, 811–817.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.007>

