



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS Y ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES
ANTIOXIDANTES EN EXTRACTOS DE MORA ANDINA (*Rubus
glaucus Benth*) DE ECUADOR.

AUTORA

Daniela Stefania Armijos Montesinos

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES EN EXTRACTOS DE
MORA ANDINA (*Rubus glaucus* Benth) 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 Suárez

Autora

Daniela Stefania Armijos Montesinos

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación del contenido de compuestos bioactivos y estudio de las propiedades antioxidantes en extractos de mora andina (*Rubus glaucus* Benth) de Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Daniela Stefania Armijos Montesinos, 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 PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Determinación del contenido de compuestos bioactivos y estudio de las propiedades antioxidantes en extractos de mora andina (*Rubus glaucus* Benth) de Ecuador, del estudiante Daniela Stefania Armijos Montesinos, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Isabel Ballesteros Redondo

Doctora en Biología

CC: **1757168610**

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”

Daniela Stefania Armijos Montesinos

CC: 1721316758

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su bondad y mis padres por ser el motor de mi vida y mi ejemplo de perseverancia y trabajo, gracias por su amor y paciencia. A mi hermano Omar por ser la razón de cada esfuerzo y anhelo de superación, a mi novio y mejor amigo Rafael por su apoyo incondicional, su compañía y su consuelo.

Agradezco al Doctor José Miguel Álvarez por haber confiado en mí para ser parte de su proyecto de investigación y brindarme su dirección y respaldo.

DEDICATORIA

A la señora Raquelita Villacis y a mi hermosa Dianita Alcívar por haberme enseñado la belleza de la vida. A mis padres quienes han sostenido mi mano en cada etapa y quienes me han dado de sus fuerzas cuando han desfallecido las mías, este logro más es para ustedes, los amo.

Finalmente, este trabajo es para quien ha estado en los momentos buenos y malos y para aliviar mis angustias y celebrar mis triunfos, esto también es suyo, lo amo amor.

RESUMEN

La mora (*Rubus glaucus* benth) es un fruto rojo de alto consumo alrededor del mundo, apetecible por su exótico sabor. Su producción nativa se encuentra en las zonas tropicales de América y en el Ecuador en toda la zona Andina del país. La mora, en comparación con otros frutos rojos, es apreciada por poseer compuestos bioactivos los cuales son sustancias beneficiosas para la salud humana especialmente por su capacidad de contrarrestar enfermedades vinculadas al estrés oxidativo. En este estudio se planteó la realización de una caracterización química completa de las moras andinas recolectadas de Machachi, Cayambe y Ambato por ser zonas de alta producción de moras en el Ecuador para ello se utilizaron técnicas cuantitativas para determinar compuestos de interés tales como polifenoles totales, flavonoides, taninos, antocianinas, β -caroteno, vitamina C así como también se realizó una identificación de los compuestos mas representativos del fruto de estudio mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas. Además, se realizó la determinación de la capacidad antioxidante mediante los ensayos de capacidad de reducción férrica (FRAP) y la técnica de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados obtenidos revelan que las muestras estudiadas poseen similitud en el contenido de fenoles, flavonoides, antocianos y taninos, mostrando diferencias únicamente en el contenido de vitamina C y betacarotenos dependiendo de la zona. Este estudio establece las bases para impulsar la investigación de los frutos exóticos ecuatorianos además de aportar conocimientos para su uso terapéutico.

ABSTRACT

The blackberry (*Rubus glaucus* benth) is the red fruit of high consumption appealing for its exotic flavor around the world. Its native production is found in the tropical zones of America and, in Ecuador, throughout the Andean area of the country. Blackberry fruits, in comparison with other red fruits, are appreciated for possessing bioactive compounds which beneficial effects in human health, especially for their ability to prevent diseases linked to oxidative stress. In this study, a complete chemical characteristic of the berries collected from Machachi, Cayambe and Ambato was proposed, for which quantitative techniques were used for determine compounds of interest such as, total polyphenols, flavonoids, tannins, anthocyanins, β -carotene, vitamin C as well as an identification of the most representative phenolic acids through the high-pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry. In addition, the determination of the antioxidant capacity of frutis was carried out by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH method of antioxidant assay. The results obtained reveal that the samples studied have a similarity in the content of phenols, flavonoids, anthocyanins and tannins, which differ only in the content of vitamin C and beta-carotene depending on the area. This study establishes the bases to promote the investigation of exotic ecuadorian fruits as well as providing knowledge for its therapeutic use.

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 del trabajo..... | 4 |
| 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 2.1 Características generales | 5 |
| 2.1.1 Origen e historia | 5 |
| 2.1.2 Taxonomía..... | 6 |
| 2.1.3. Morfología..... | 6 |
| 2.1.4. Requerimientos del cultivo..... | 10 |
| 2.2. Composición química..... | 11 |
| 2.2.1 Flavonoides | 11 |
| 2.2.2 Antocianinas | 13 |
| 2.2.3. Taninos..... | 15 |
| 2.2.4. Carotenoides | 18 |
| 2.2.5. Fenoles..... | 20 |
| 2.2.6. Vitaminas..... | 21 |
| 2.3. Capacidad antioxidante | 23 |
| 2.3.1 Estrés oxidativo | 23 |
| 2.3.2 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo..... | 24 |
| 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL .. | 27 |
| 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS | 28 |
| 4.1. Población y muestra | 28 |
| 4.1.1 Población..... | 28 |
| 4.1.2 Muestra..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2. Preparación de muestras | 28 |
| 4.3.Extracto rico en polifenoles | 28 |
| 4.3.1. Caracterización de polifenoles aislados por HPLC- DAD/ESI- MSn | 29 |
| 4.3.2. Análisis de antocianinas | 30 |
| 4.3.3. Análisis de flavonides y otros derivados fenólicos | 30 |
| 4.4. Extracto metanólico | 31 |
| 4.4.1.Determinación de fenoles | 32 |
| 4.4.2.Determinación de flavonoides..... | 32 |
| 4.4.3.Determinación de antocianinas..... | 33 |
| 4.5. Determinación de taninos | 33 |
| 4.6. Extracto rico en β - Caroteno | 34 |
| 4.6.1.Determinación de β - Caroteno mediante HPLC | 36 |
| 4.7. Determinación de vitamina C..... | 37 |
| 4.8. Determinación de la capacidad antioxidante | 37 |
| 4.8.1.Determinación mediante el metodo de FRAP..... | 38 |
| 4.8.2.Capacidad de captación de radicales libres por el método de DPPH..... | 38 |
| 4.9. Análisis estadístico de los resultados | 39 |
| 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 39 |
| 5.1. Caracterización química de las moras andinas | 39 |
| 5.2. Identificación de los compuestos fenólicos en moras andinas | 41 |
| 5.3. Capacidad antioxidante de las moras andinas | 45 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 49 |
| 6.1. Conclusiones | 49 |
| 6.2. Recomendaciones | 49 |
| REFERENCIAS | 50 |

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes.

Numerosos estudios han demostrado que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y las alteraciones bioenergéticas son los principales factores que intervienen en el envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como: cáncer, Alzheimer, diabetes y enfermedades cardiovasculares(Del Rio et al., 2013, pp. 42-45). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), principal fuente de daño celular se produce principalmente en las mitocondrias y se acumula durante el envejecimiento. El estrés oxidativo, inducido por una producción elevada de ROS, conduce a su vez a daños acumulados en el ADN mitocondrial (ADNmt), perpetuando así el aumento de la producción de ROS y transferencia de electrones aberrantes de la cadena, afectando la reducción de la síntesis de ATP y la función mitocondrial (Del Rio et al., 2013, pp. 43-52). Todos estos procesos oxidativos causan además un aumento en el daño a otras macromoléculas (proteínas, lípidos) celulares, lo que conlleva a alteraciones en la funcionabilidad de la célula y por tanto alteraciones en las funciones fisiológicas de los tejidos y órganos de los cuales forman parte. En este sentido, la dieta juega un papel crucial en la prevención de este tipo de enfermedades (Del Rio et al., 2013, pp. 55-57), donde patrones dietéticos basados en el alto consumo de frutas y verduras, se han asociado con una mayor esperanza de vida y una disminución significativa de la incidencia y prevalencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo(Bach-Faig et al., 2011, pp. 2274-2284). Dado que el desequilibrio entre el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes endógenas/exógenas del cuerpo está estrechamente vinculada a la patogénesis de este tipo de enfermedades, los componentes antioxidantes presentes en las frutas y verduras pueden desempeñar un importante papel en la protección de las macromoléculas del daño producido por los ROS y, por ende, contribuir a mejorar el estado antioxidante del organismo. Esto se debe a su alto contenido en fitoquímicos (Del Rio et al., 2013, pp. 1818-1892) y la potente acción antioxidante que estos

ejercen (Kaume et al., 2012, pp. 5716-5727), basada en su capacidad de *radical scavenging* o bloqueadora de los radicales libres generados en exceso durante el proceso de respiración celular (Diamanti et al., 2014, pp. 3935-3943) y en la activación de ciertas rutas bioquímicas relacionadas con la respuesta antioxidante (Giampieri et al., 2014, pp. 3867- 3876).

Recientemente, las frutas consumidas por las poblaciones andinas de América del Sur han sido objeto de un creciente interés, sobre todo debido a sus potenciales beneficios para la salud y al interés de los consumidores por nuevas frutas exóticas, en particular, en los mercados internacionales. Sin embargo, mientras que las propiedades relacionadas con la salud y la composición química de las frutas y plantas que comúnmente se encuentran en América del Norte y Europa han sido ampliamente estudiadas, en el caso de las frutas andinas, como las nativas de Ecuador, son aún las grandes desconocidas. Varios estudios han destacado el posible potencial terapéutico de ciertas bayas de la región, entre las que destacan la mora andina (*Rubus glaucus* B.), el tomate de árbol (*Solanum betaceum* C.) (Carrillo-Perdomo et al., 2015, pp. 49-69), y el Capulí (*Prunus serótina*) (Alvarez-Suarez et al., 2017, pp. 46-52). Sin embargo, pese a esto, los estudios relacionados a su contenido en compuestos bioactivos y su efecto sobre la salud son todavía limitados.

La mora andina (*Rubus glaucus* Benth), constituye el fruto rojo mayormente comercializado y consumido en Ecuador, con una producción anual estimada de 60.000 toneladas/año. Los estudios composicionales actuales en este género han brindado una caracterización química general del fruto, brindando datos interesantes en cuanto a los contenidos de compuestos bioactivos, tales como antocianinas, carotenos y vitamina C (Kaume et al., 2012, pp.5716-5723). Las antocianinas representan cuantitativamente la principal clase de polifenoles identificadas en los frutos rojos (Giampieri et al., 2012, pp. 9-19; Kaume, Howard, & Devareddy, 2012, pp. 5716-5723). Varios estudios han reportado el contenido total de antocianinas en mora, con valores en el rango

de 150 a 600 mg/kg de peso fresco (Kaume et al., 2012, pp. 5716-5723). Más de 25 diferentes antocianinas han sido descritas en frutos rojos de diferentes variedades y regiones geográficas, donde la pelargonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido han sido reportadas como las principales antocianinas (Carrillo-Perdomo, Aller, Cruz-Quintana, Giampieri, & Alvarez-Suarez, 2015; Kaume et al., 2012, pp. 5716-5723). Además de las antocianinas, otros compuestos bioactivos importantes ha sido identificados en estos frutos, como son los elagitaninos y folatos, que contribuyen también a la alta capacidad antioxidante y calidad nutricional del fruto (Kaume et al., 2012, pp. 5716-5723) y por ende a sus potenciales efectos beneficiosos para la salud.

A pesar de estos reportes, las características composicionales de la mora andina han sido escasamente estudiadas. Esto, sumado a las propias capacidades de las plantas de potencializar sus características físicas y químicas según la región o las condiciones climáticas en donde se cultiva (CORPEI, 2009, pp.3-10), ha despertado el interés de investigadores de la región para (I) profundizar en la composición química de este fruto y (II) determinar sus efectos beneficiosos sobre la salud .

1.2 Planteamiento del problema.

En el Ecuador las diferentes culturas utilizan un tercio de las especies vegetales tanto para alimentación como para usos de medicina ancestral. Un ejemplo de ello son alimentos de significado cultural, como la colada morada, con el protagonismo de los frutos rojos en su preparación (Gualavisí, 2008, pp.2-6; Moscoso, 2013), no obstante, las especies vegetales, especialmente los que dan origen a los frutos rojos como la mora andina, no son considerados como alimentos de alto potencial benéfico para la salud debido al desconocimiento de sus propiedades favorecedoras. Tal desconocimiento ha limitado en Ecuador apreciar y fomentar el consumo habitual de este tipo de fruto como fuente natural de compuestos bioactivos con importantes propiedades protectoras y antioxidantes que pueden mejorar la condición de

personas con enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Sánchez & Méndez, 2013, pp. 161-168) o incluso prevenir el padecerlas en el futuro.

Por ello se plantea la necesidad de profundizar en este tipo de estudios, lo que permitiría justificar y fomentar su uso como fuente natural de compuestos bioactivos en la dieta, así como en la elaboración de formulaciones y productos biotecnológicos.

1.3 Objetivo General

Determinar el contenido de compuestos bioactivos y estudiar sus propiedades antioxidantes en extractos de mora andina.

1.4 Objetivos específicos.

Determinar la composición química de extractos de mora andina mediante el uso de técnicas espectrofotométricas y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Determinar la capacidad antioxidante del extracto de mora andina por medio de la detección de su capacidad para captar radicales libres y su potencial reductor férrico.

1.5 Justificación del trabajo.

Los frutos rojos han demostrado aportar beneficios excepcionales a la salud humana en la prevención de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo tales como cáncer, diabetes, Alzheimer etc (Carrillo-Perdomo et al., 2015, pp. 49-69). La razón de estas cualidades benéficas radican en poseer un grupo de

compuestos bioactivos tales como antocianinas, vitaminas, minerales y fibra con justificada acción en la prevención del daño oxidativo (Juranić & Žižak, 2005, pp. 207-211; Schreckinger, Lotton, Lila, & Mejia, 2010, pp. 233-246; Zafra-Stone et al., 2007, pp. 675-683).

Atendiendo a los antecedentes antes expuestos, la presente propuesta se justifica en la necesidad de aportar nuevos conocimientos en la composición química y los efectos beneficiosos para la salud de los frutos de mora andina. Los resultados de nuestra propuesta permitirán justificar su uso como fuentes naturales de productos bioactivos en la dieta de la población ecuatoriana con efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Mediante la presente propuesta se pretende además promover la diversificación, así como también el mejoramiento de la calidad nutricional en la dieta de la población ecuatoriana.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

2.1 Características generales.

2.1.1 Origen e historia.

La mora o zarzamora es un fruto rojo originario de América, específicamente de sus zonas altas tropicales en las que se encuentran Estados Unidos, Ecuador, Colombia, Honduras, México entre otros (Betancur, García, Barrera, & Quejada, 2015, pp.7-9).

No fue hasta el año 1840 cuando el botánico alemán Karl Theodor Hartweg, recogió por primera vez plantas de “mora de Castilla” en los huertos artesanales de los alrededores de la ciudad de Quito, los cuales se encontraban ubicados en las laderas del Pichincha, lo que permitió que en 1845 pudieran ser nombradas como *Rubus glaucus* y descritas para la ciencia de la colección de Hartweg. En la época colonial, la sociedad comerciante quiteña catalogaba bajo el termino “Castilla” a todo producto que se

consideraba de buena calidad y características superiores debido a su procedencia española, fue así que por las características de la mora se popularizó comercialmente como mora de castilla, sin embargo, la ciencia y la botánica permitió diferenciar la mora proveniente del Ecuador y resaltar su origen natal con el tiempo (Jardín Botánico, 2017).

2.1.2 Taxonomía.

La planta de mora es del reino vegetal, división antófila, clase dicotiledónea, subclase alquiclamídea, orden rosales, familia *Rosácea* y pertenece al género *Rubus*. Su nombre científico es *Rubus glaucus* Benth mientras que su nombre común es mora de castilla o mora Andina (Betancur et al., 2015, pp.10-14; Ramos, 2016, pp. 39-40).

2.1.3 Morfología.

La mora es una planta arbustiva, perenne, de naturaleza trepadora, cuya altura puede llegar hasta los tres metros (Betancur et al., 2015, pp.10-14). Dentro de sus principales estructuras se encuentran:

Raíz. Son nudosas, filiformes y racimosas. La raíz principal o pivotante puede alcanzar una profundidad de 30 a 50 cm del suelo, sus raíces secundarias son poco profundas, se encuentran entre 10 a 20 cm del suelo y poseen crecimiento horizontal (Ramos et al., 2016, pp. 40-41).

Tallo. A partir de la corona se forman los tallos de manera continua, pueden ser de 5 a 15 lo cual lo clasifica como semi arbustivo. Los tallos primarios pueden llegar a medir hasta 2 metros además de sus tallos secundarios y terciarios que tienden a ser levemente más cortos. Los tallos se encuentran rodeados por espinas curvas de 2 a 3 mm de longitud como se muestra en la

figura 1. Su comportamiento es bianual debido a que crecen durante el primer año y en el segundo florecen y producen (Ramos et al., 2016, pp. 40-41).



Figura 1. Tallo de planta de Mora.

Adaptado de (Ramos, 2008, p.12).

Hojas. Son trifoliadas, alternas, elípticas, de largo peciolo y enteras, su cara inferior posee una coloración clara, son puntiagudas y su borde es ligeramente dentado y ondulado como puede apreciarse en la *figura 2* (Ramos, 2016, pp.40-41).



Figura 2. Hoja de planta de Mora.

Adaptado de (Ramos, 2008, p.12).

Flores. Son de color blanco y hermafroditas como se evidencia en la *figura 3*, miden de 2 a 2.5 cm de diámetro, de corto pedúnculo, su cáliz consta de cinco sépalos verdes, lanceoladas, lineales y su corola de cinco pétalos que pueden ser blancos, rojos o lilas además de poseer estambres desiguales (Ramos, 2016, pp.40-41).



Figura 3. Flor de planta de Mora.

Adaptado de (Ramos, 2008, p.13).

Semilla: El tipo de semillas que se encuentra en la mora está clasificada dentro del grupo de las ortodoxas, son diminutas con diámetros de 1.2 a 1.3 milímetros, de color café. Una planta de características estándar puede llegar a producir alrededor de 130,000 semillas (Ramos et al., 2016, pp. 40-41).

Fruto. Está formado por la agrupación de drupas entre 70 a 100, cada una con una semilla en su parte interna que en conjunto dan lugar a un fruto de 5 a 7 mm de diámetro, cada fruto formado por 65 semillas aproximadamente considerando que su distribución es en gajos de 5 a 8 frutos, cada uno de ellos con maduración dispereja, su peso individual es de 0.2 gramos, y su coloración puede ir desde rojo purpura brillante hasta un negro rojizo como se muestra en la *figura 4*. Una planta promedio puede llegar a tener hasta 3.600 frutos.



Figura 4. Fruto de planta de Mora.

Adaptado de (Ramos, 2008, p.13).

2.1.4. Requerimientos del cultivo.

Clima. La mora es un cultivo que puede adaptarse a un rango de altura sobre el nivel del mar entre 1.200 a 3.500 metros, siendo el rango más apropiado entre los 1.800 a 2.400 metros. La temperatura puede oscilar entre los 12 y 18 grados centígrados, con una humedad del 70 al 80 %, precipitaciones de 1.200 a 1.700 milímetros anuales, 1.200 a 1.600 horas de luminosidad anuales y lugares sin probabilidades de heladas (MAGAP, 2013,pp.6-7)

Suelo. Deben ser preferencialmente franco- arenosos es decir poseer una composición de arena, lino, arcilla, fosforo y potasio, además de que deben ser suaves hasta un metro de profundidad (Ramos et al., 2016, pp. 40-41).

pH. Puede oscilar del 5.5 a 7 debido que a mayor o menor que el rango establecido existirá problemas con indisponibilidad de nutrientes o mayor solubilidad de minerales (Ramos et al., 2016, pp. 40-41).

Conductividad eléctrica. Debe existir bajas concentraciones de sales en el suelo debido a que el valor de conductividad eléctrica para el cultivo debe de ser de $1.50 \text{ mmhos cm}^{-1}$, si la concentración de sales es elevada existirá toxicidad de sales y por consecuencia problemas nutricionales y de permeabilidad (Ramos et al., 2016, pp. 40-41).

2.2. Composición química.

2.2.1 Flavonoides.

El termino flavonoides es utilizado para denominar al conjunto de compuestos fenólicos cuya formación química se basa en tres anillos derivados del ácido cinámico con un total de 15 átomos de carbono como se puede ver representado en la *fiigura 5* (Cartaya & Reynaldo, 2001, pp.5-14).

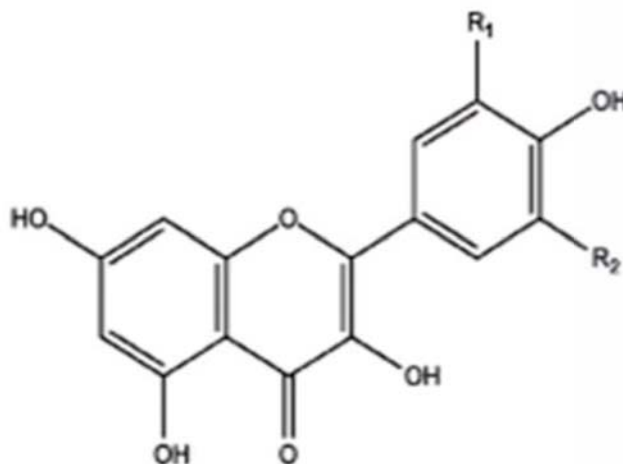


Figura 5. Estructura de los flavonoides.

Adaptado de (Kaume et al., 2012, p.5718).

Este grupo es el más considerado cuando se analizan plantas superiores debido a que se encuentra presente en todos sus órganos vegetativos. En el mundo se conocen más de 4.000 flavonoides a los cuales se les atribuyen funciones antioxidantes, insecticidas, antiparasitarios y reguladores de crecimiento por su interacción con hormonas como la auxina (Barreno, Brugués, & Costa, 1997; Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015, pp. 25-33).

Entre los flavonoides más incidentes en los grupos de plantas vasculares se encuentran el kaempferol, la miricetina y la quercetina. En la clasificación vegetal la cuantificación de concentración de determinados flavonoides permite la diferenciación entre tipos de plantas, por ejemplo, la presencia o ausencia de miricetina, ácido gálico y protoantocianidinas da la pauta para diferenciar a tres conjuntos de subclases de dicotiledóneas (Barreno et al., 1997).

En la tabla 1 se presentan los principales flavonoides reportados en diferentes especies de mora.

Tabla 1.

Tipos de flavonoides presentes en moras.

| Flavonoides identificados en moras | |
|---|---|
| Quercetina 3- galactósido | Kaempferol 3- galactósido |
| Quercetina 3- glucósido | Kaempferol 3- xilosiloglucurónido |
| Quercetina 3- rutinósido | Quercetina 3- glucurónido |
| Quercetina 3- xylosylglucuronide | Quercetina 3-O-[6-(3-hidroxi-3-metil-glutarilo)- β -D-galactósido |
| Quercetina 3- glucosilopentosido | Miricetina |
| Kaempferol 3- glucósido | Quercetina 3-metoxihexosido |
| Kaempferol 3-glucurónido | Quercetina 3-oxalilopentosido |

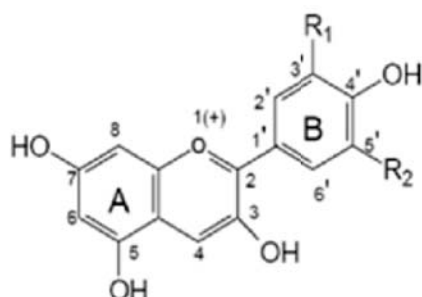
Adaptado de (Kaume et al., 2012, p.5718).

2.2.2. Antocianinas.

Es un grupo de pigmentos flavonólicos hidrosolubles responsables de brindar la gama de colores desde el rojo, azul y púrpura en cereales, frutos y vegetales (Cerón, 2008, pp.1-2).

Químicamente son glucósidos de antocianidinas, con una estructura que se basa en un núcleo de flavón, el cual está constituido por dos anillos aromáticos unidos por 3 carbonos como se observa en la *figura 6*. Hasta el momento se conocen aproximadamente 20 antocianidinas de las cuales las más importantes son la pelargonidina, peonidina, malvidina entre otras, cuyos

nombres se derivan de su origen de extracción. La combinación de estas con los distintos tipos de azúcares forman 150 antocianinas aproximadamente. La coloración de los frutos dependerá de varios factores intrínsecos, principalmente el aumento de hidroxilos o metoxilos los cuales fomentaran el color azul o el rojo respectivamente (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011, pp.16-21; Garzón, 2008, pp. 27-36; Zapata et al., 2014, pp. 166-192).



| Aglicona | Sustituyentes | | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) |
|---------------|---------------|------|-----------------------------|
| | R1 | R2 | |
| Pelargonidina | H | H | 494 (naranja) |
| Cianidina | OH | H | 506 (naranja-rojo) |
| Delfinidina | OH | OH | 508 (azul-rojo) |
| Peonidina | OCH3 | H | 506 (naranja-rojo) |
| Petunidina | OCH3 | OH | 508 (azul-rojo) |
| Malvinidina | OCH3 | OCH3 | 510 (azul-rojo) |

Figura 6. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.

Adaptado de (Garzón, 2008, p.29).

Diversos estudios respaldan que los extractos ricos en antocianinas generan varios beneficios en la planta como protectores de rayos ultravioletas y como precursor de la polinización. Además que en el ser humano aportan ventajas para la salud tales como aumento de la agudeza visual, aumento de la actividad antioxidante, capacidad de atrapar radicales libres, funciones quimio-protectores, así como también control de lípidos, regulación de la secreción de

insulina, lo cual está directamente relacionado con las propiedades antidiabéticas, anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias y de protección ante enfermedades cardiovasculares de estos compuestos (Aguilera et al., 2011, pp. 16-21).

En las moras andinas se han identificado las antocianinas descritas en la tabla 2.

Tabla 2.

Tipos de antocianinas presentes en moras.

| Antocianinas identificadas en moras | |
|--|-----------------------------------|
| Cianidina 3-glucósido | Cianidina 3-arabinosido |
| Cianidina 3-galactósido | Malvidina 3-arabinosido |
| Cianidina 3-xilósido | Perlargonidina 3-glucoside |
| Cianidina 3- dioxaly l –glucósido | Cianidina 3-(6-malonil) glucósido |
| Cianidina 3-rutinósido | Cianidina 3-(3-malonil) glucósido |
| Cianidina 3-soforosido | Cianidina 3-dioxaloilglucósido |
| Cianidina 3-glucosilrutinosido | Cianidina 3-arabinosido |
| Malvidina 3-arabinosido | |

Adaptado de (Kaume et al., 2012)

2.2.3. Taninos

Los taninos forman parte de los compuestos fenólicos, los cuales tienen como característica ser hidrosolubles, poseer un peso molecular que se encuentra entre 500 a 3.000 D, en la *figura 7* se muestra su conformación basada en la unión de varios grupos fenólicos así como también de anillos aromáticos,

además de poseer en su estructura gran número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales que tienen la capacidad de unirse a macromoléculas (Alvarez, 2011, pp.3-8; Martínez-Valverde, Periago, & Ros, 2000, pp. 5-18).

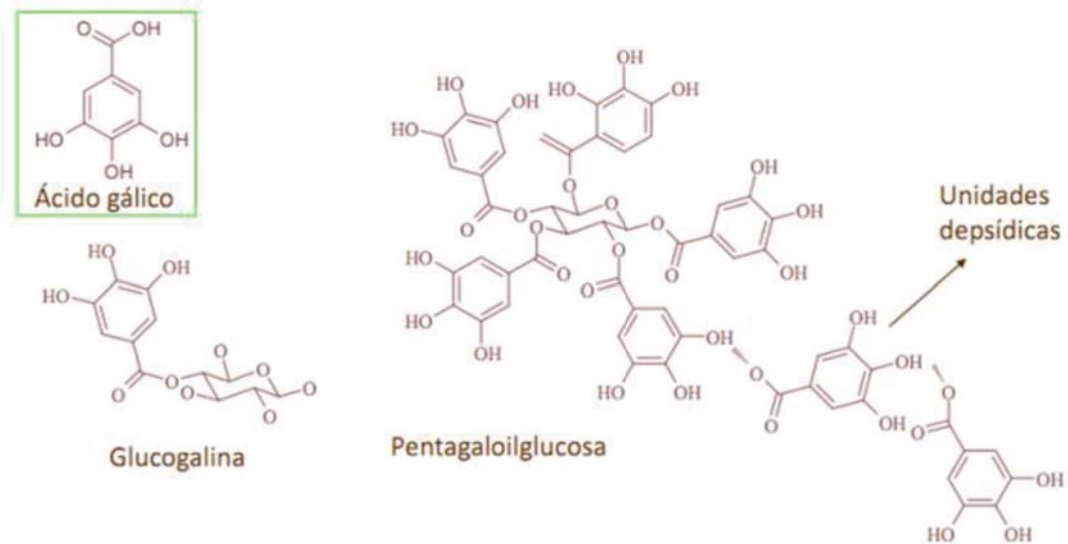


Figura 7. Estructura de los taninos gálicos.

Adaptado de (Alvarez, 2011, p.3).

Entre sus propiedades más sobresalientes se encuentran la capacidad de formar complejos con proteínas, lo que les permite generar un sabor característico, también conocido como gusto tánico. Además debido a su capacidad de consumir oxígeno disuelto es considerado como un antioxidante de gran interés en la industria tanto farmacéutica como alimentaria (Alvarez, 2011, pp. 1-13).

Los taninos se clasifican según su función estructural en dos grupos:

Proantocianidinas o taninos condensados: También llamados leucoantocianinas, son oligómeros y polímeros de flavonoides, formados estructuralmente de 2 a 6 núcleos fenólicos (flavan-3-ol o catequinas). Las

unidades flavan-3-ol son polimerizadas por enlaces carbono - carbono (Martínez, 2007, pp.13-16).

En los frutos rojos, especialmente en las bayas, se encuentran dos tipos de taninos condensados: procianidinas las cuales se muestran estructuralmente identificadas en la *figura 8* y propelargonidinas.

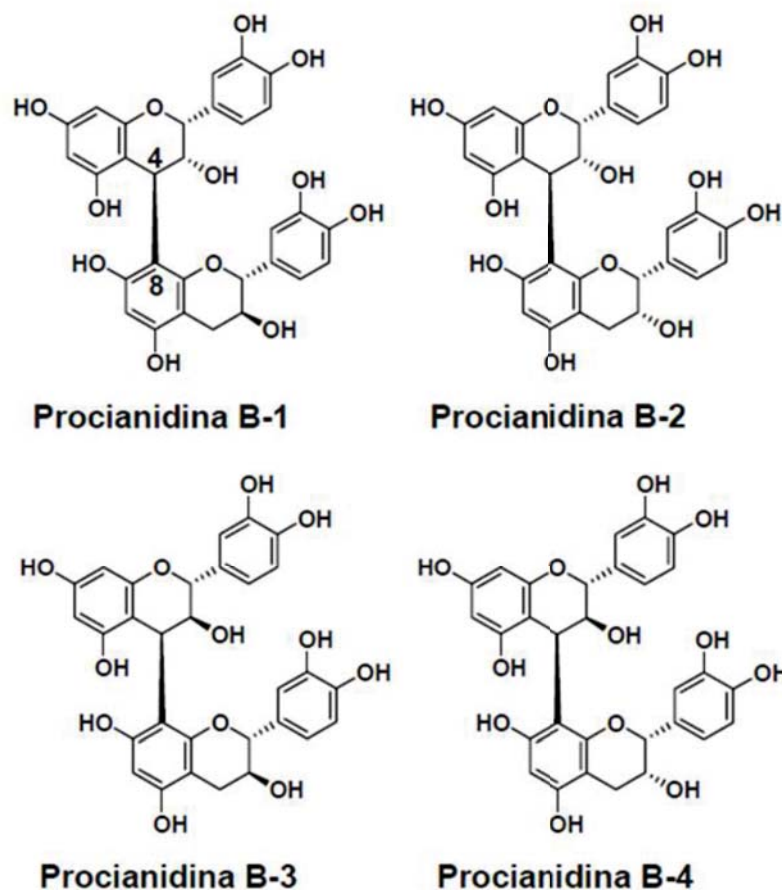


Figura 8. Procianidinas dimeras principales.

Adaptado de (Martínez, 2007), p.14.

Taninos hidrolizables: Existen dos tipos: Los elagitaninos, los cuales en la hidrólisis liberan ácido elágico los cuales están conformados por moléculas

lineales de glucosa enlazadas a grupos hexahidroxidifénicos. El segundo tipo son los galotaninos los cuales están conformados por núcleos de glucosa unidos cíclicamente por enlaces de ácido gálico (Alvarez, 2011, pp. 1-13).

En las moras se han identificado taninos hidrosolubles del tipo elagitaninos descritos en la Tabla 3.

Tabla 3.

Tipos de taninos presentes en moras.

| Taninos identificados en moras |
|--|
| Sanguiin H-6 |
| Lambertianin C |
| Pedunculagina |
| Lambertianin D |
| galoil-bis-HHDP glucosa |
| Sanguiin H-10 isomer |
| Sanguiin H-6 menos residuo de ácido gálico |
| Lambertianin C menos residuo de ácido gálico |
| galoil-HHDP glucosa |
| Sanguiin H-2 |
| Sanguiin H-6 más residuo de ácido gálico |
| Ácido elágico |
| Castalagina / vescalagina |
| Conjugados de pentosa de ácido metil elágico |

Adaptado de (Kaume et al., 2012, p. 5718).

2.2.4. Carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos responsables de las coloraciones rojizas, amarillas y naranjas en flores y frutos, además son considerados como compuestos indispensables para la vida debido a que están estrechamente vinculados con la captación de luz que activa la fotosíntesis. En la salud también posee funciones importantes ya que evita la aparición de enfermedades cardiovasculares, cáncer y previene la degeneración muscular, todo esto debido a su elevado poder antioxidante, el cual es el resultado de la capacidad de los carotenoides de inactivar el oxígeno libre, peróxidos, hidroxilos entre otros agentes oxidantes. Otra de las ventajas de los carotenoides es que actúan como fuente de provitamina A (Tobergte & Curtis, 2013, pp. 1689-1699).

En su estructura están conformados por varias unidades de isoprenoides y un anillo de ciclohexano sustituido o insaturado en cada extremo esto se debe a que los carotenos son tetra terpenos. Entre sus características están su insolubilidad en el agua debido a su naturaleza lipofílica (Tobergte & Curtis, 2013, pp. 1689-1699).

Betacaroteno. Es un carotenoide del tipo de los carotenos el cual posee actividad de provitamina A, este posee gran funcionalidad en la enfermedades coronarias además que su ingesta previene el cáncer de piel y de tracto digestivo (*Figura 9*) (Tobergte & Curtis, 2013, pp. 1689-1699).

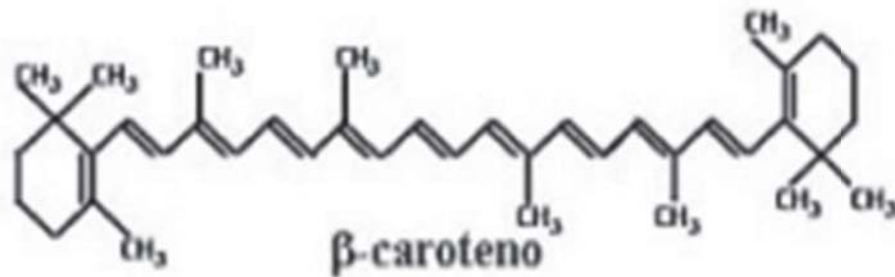


Figura 9. Estructura de β -caroteno.

Adaptado de (Urango et al., 2008, p.29).

2.2.5 Fenoles.

Los polifenoles o también conocidos como compuestos fenólicos son parte del grupo de sustancias químicas considerados metabolitos secundarios, existen alrededor de 8.000 compuestos fenólicos distintos en su conformación. Este tipo de sustancia genera colores azules, rojos, naranjas violetas y purpuras en los productos que la contienen. Su estructura química se basa en un anillo aromático, un anillo de benceno y uno o más grupos hidroxilos (Martínez-Valverde et al., 2000, pp.7-14).

Los compuestos fenólicos cumplen funciones importantes en la planta debido a que interviene directamente en el crecimiento, además de promover mecanismos antipatógenos, antibacterianas y antivirales. Además cumplen funciones anticancerígenas, antimutagénicas, antioxidantes, hepatoprotectoras,

antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antitumorales y antihipercolesterolémicas (Dueñas, Naranjo, & Araujo, 2009, pp. 1-8).

Los ácidos fenólicos identificados en moras andinas se encuentran descritos en la tabla 4.

Tabla 4.

Ácidos fenólicos presentes en moras.

| Ácidos fenólicos identificados en moras |
|--|
| Ácido cafeico |
| Ácido cumárico |
| Derivados del ácido ferúlico |

Adaptado de (Carrillo-Perdomo et al., 2015, p. 571.)

2.2.6 Vitaminas.

El ácido ascórbico o también conocido como vitamina C es la principal vitamina identificada en los frutos de mora. Está considerado como un agente antioxidante por excelencia, además actúa directamente sobre ciertos órganos tales como los ojos, el bazo, el hígado, las glándulas suprarrenales y el cerebro. Dentro de sus características químicas es una vitamina hidrosoluble esencial que se sintetiza a partir de la glucosa, es alcalino de coloración ligeramente amarillo, fotosensible e inoloro, es considerada importante en la ingesta diaria debido a que su déficit genera la enfermedad denominada escorbuto, no obstante, esta vitamina aporta varios beneficios tales como mejorar el mantenimiento celular y elevar el sistema inmunológico, combatir

enfermedades infecciosas, interviene en la cicatrización y colabora en el proceso de desinflamación (Sandoval, 2010,pp.7-9; Serra & Cafaro, 2007,pp. 526-527).

Su estructura química tal como se evidencia en la *figura 10* está conformada por una lactona de 6 carbonos que tiene relación con la glucosa y otras hexosas, las cuales poseen una agrupación diol lo que le permite cumplir funciones de reductor energético, además, al poseer dos carbonos asimétricos correspondientes al C4 y C5 se generan isómeros ópticamente activos (Oro & Donnamaría, 2006, pp.148-151).

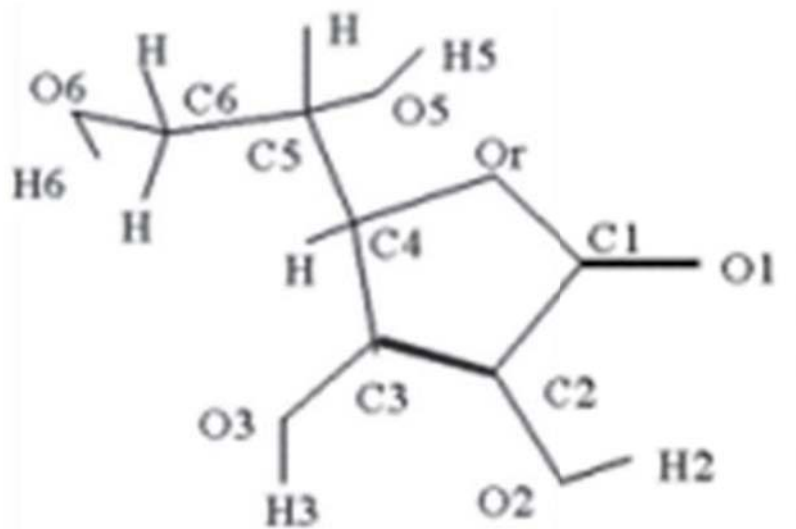


Figura 10. Estructura del ácido ascórbico.

Adaptado de (Oro & Donnamaría, 2006, p.150).

En los frutos rojos, principalmente en las moras se han registrado las vitaminas descritas en la tabla 4 como las que se encuentran en mayor proporción, no obstante, también se encuentran en menor cantidad el ácido fólico, vitamina k y tocoferol β , γ .

Tabla 5.

Vitaminas presentes en moras.

| Vitamina | Cantidad |
|--------------------------------------|-----------------|
| Ácido ascórbico | 21 mg |
| Tiamina | 0.02 mg |
| Riboflavina | 0.03 mg |
| Acido pantoténico | 0.28 mg |
| Vitamina B6 | 0.03 mg |
| α-tocoferol | 1.17 mg |

Adaptado de (Carrillo-Perdomo et al., 2015, p. 58.)

2.3 Capacidad antioxidante

2.3.1 Estrés oxidativo

Las especies reactivas son las moléculas responsables del estrés oxidativo. Dentro del concepto general existen dos especies reducidas del oxígeno, entre los que se encuentran los radicales libres y el peróxido de hidrogeno (Sánchez & Méndez, 2013, pp.163-164). Los radicales libres son las moléculas causantes del desequilibrio redox a nivel celular, el cual puede provocar daños a nivel de tejidos, además de un envejecimiento celular prematuro (Tetteh, 2012, pp. 1-2)- Esto se debe fundamentalmente a que en su estructura poseen electrones desapareados, los mismos que las hacen altamente reactivas cuando se combinan inespecíficamente aportándoles la capacidad de atacar cualquier tipo de biomolécula (Corrales & Ariza, 2012, p. 214).

El principal efecto deletéreo de los radicales libres en los tejidos radica en su capacidad para incorporar, a partir de otra molécula, un electrón a su estructura buscando estabilidad. Dicha incorporación genera inestabilidad en la molécula de la cual tomó dicho electrón provocando alteraciones estructurales y funcionales en la misma (Corrales & Ariza, 2012, pp. 213-225). Además, también existen factores externos que pueden desencadenar la aparición de radicales libres, entre ellos se encuentran el humo del cigarrillo, la contaminación de aire, la radiación y el consumo excesivo de sustancias nocivas como drogas o alcohol (Tetteh, 2012, pp. 1-2).

2.3.2 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Las enfermedades más representativas relacionadas directamente con el estrés oxidativo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.

Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

| Enfermedades | Fundamento |
|-----------------------|--|
| Envejecimiento | El envejecimiento se produce por la exposición crónica a radicales libres, inactivación de enzimas antioxidantes, disminución de actividad proteolítica y la actividad antioxidante, acumulación de proteínas oxidadas y aumento de producción de peróxido de hidrogeno y oxígeno. Todos estos como factores de envejecimiento celular además de los factores genéticos y ambientales. |

| | |
|---|---|
| Alzheimer | Pérdida progresiva de neuronas vinculadas con la agregación de placas de la proteína β -amiloide y estructuras neurofibrilares de las proteínas Tau. Existe un evidente aumento de radicales libres y marcadores de oxidación de proteínas, lípidos, ADN aumentando la toxicidad de las células y el daño a nivel mitocondrial mientras se genera una reducción en el aclaramiento de glutamato el cual es el neurotransmisor por excelencia de la corteza cerebral humana. |
| Parkinson | Se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas. El envejecimiento y el estrés oxidativo es el responsable de la pérdida de células nigroestriadas y los defectos en la cadena de respiración mitocondrial, debido a desencadenar un aumento de los niveles de peroxidación lipídica, reducción de ácidos grasos libres poliinsaturados de la sustancia nigra y aumento de citoquinas proinflamatorias. |
| Esclerosis lateral amiotrófica | Se presenta por la degeneración de neuronas motoras, las mismas causadas por la inhibición de la enzima superóxido dismutasa mediado por la suplementación de N-acetilcisteína, lo cual desencadena la aparición de radicales libres. Los cuales generan una evidencia de células oxidadas post mortem. |
| Carcinogénesis | Es la proliferación descontrolada de células cancerosas y neo-vascularización. La presencia de radicales libres activan mecanismos implicados en la |

| | |
|--------------------------|---|
| | <p>transformación maligna de células producto de la deficiencia de enzimas antioxidantes. Se ha identificado que los radicales libres están vinculados con la iniciación y mantenimiento del fenotipo tumoral, donde el peróxido de hidrogeno estimula la proliferación y activación de oncogenes.</p> |
| Diabetes Mellitus | <p>La elevada concentración de glucosa disminuye la actividad de proteínas además de generar una autoxidación de azúcares que producen radicales libres por la disminución de la hemoxygenasa1 que afecta directamente a las células B del páncreas generando los principios de la enfermedad.</p> |
| Hepáticas | <p>Se ha evidenciado aparición de estrés oxidativo en los mecanismos de inflamación, así como en cirrosis, pancreatitis y alteraciones digestivas. Todo esto debido al aumento de la peroxidación de lípidos y disminución de enzimas antioxidantes.</p> <p>En el caso de la hepatitis fulminante los radicales libres activan receptores de apoptosis como fas- ligando y factores de necrosis tumoral</p> |

Adaptado de (Sánchez & Méndez, 2013, pp.164-166).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

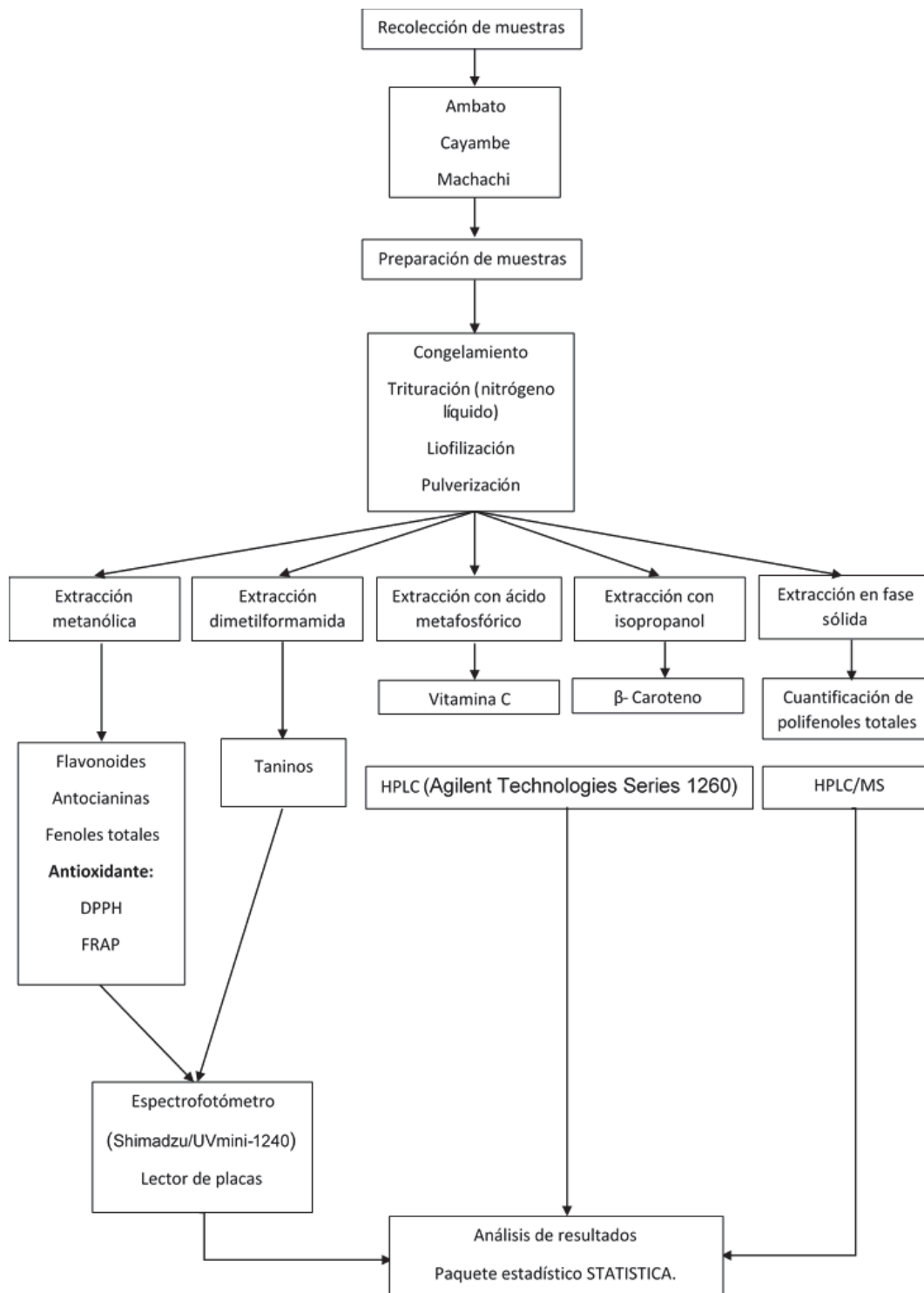


Figura 11. Diagrama de flujo del diseño del experimental.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra.

4.1.1 Población.

Las poblaciones estudiadas correspondieron a los frutos de mora andinas (*Rubus glaucus* Benth) del Ecuador.

4.1.2 Muestra

Las muestras utilizadas correspondieron a los frutos de mora andinas (*Rubus glaucus* Benth) provenientes de los mercados populares de Machachi, Cayambe y Ambato.

4.2 Preparación de las muestras.

Los especímenes (*Rubus glaucus* Benth) fueron identificados por especialistas del Jardín Botánico de Quito, Ecuador, utilizando las 3 muestras de referencia depositadas en el herbario de dicho centro. Las muestras fueron lavadas y trituradas con nitrógeno líquido haciendo uso de pistilo y mortero. Posteriormente a las muestras trituradas se enviaron al liofilizador y el liofilizado obtenido se conservó en refrigeración a -20°C.

4.3 Extracto Rico en Polifenoles

El extracto rico en polifenoles se realizó a través de una extracción en fase sólida en columna de Amberlita X-20 siguiendo la metodología previamente descrita por Giampieri et al., (2014). Previo a la extracción se realizó un acondicionamiento de la columna de amberlita (Supelco) usando lavados seriados (2 L) de las soluciones de hidróxido de sodio (1 Mm), ácido clorhídrico (0.1M) y agua-ácido fórmico (99:1, v/v) por 20 min cada una. Posteriormente se

pesaron 20 g de muestra liofilizada y se colocaron en ácido fórmico/metanol en una proporción (1:3 p/v), la mezcla fue sometida a baño de ultrasonido (Fisher Scientific / Ultrasonic Beth 5,7L) por una hora y se filtró. El filtrado resultante se secó en un rotavapor a 45 °C y el residuo seco obtenido se resuspendió en una solución de agua/ácido fórmico (1:3 p/v). Esta solución se pasó a través de la columna de amberlita la cual posteriormente fue lavada tres veces con agua destilada para eliminar los residuos de azúcares y otras sustancias que pudieran causar interferencia en los análisis posteriores. La fracción rica en polifenoles se obtuvo a partir de la elución del contenido retenido en la columna con una solución de ácido fórmico/metanol (1:3 p/v). El contenido obtenido fue llevado al rotavapor (Buchi/R210) para eliminar el solvente y el residuo obtenido se almacenó a -20 °C.

A partir de este extracto se realizaron los análisis de caracterización de polifenoles aislados, antocianinas, flavonoides y otros derivados fenólicos. Para cada análisis se tomaron tres muestras del extracto.

4.3.1. La caracterización de polifenoles aislados por HPLC-DAD / ESI-MSn.

Los análisis HPLC se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de matriz de diodos (DAD) acoplado a una Estación de procesamiento de datos HP Chem Station (Rev. A.05.04) y una bomba binaria. El sistema HPLC se conectó a un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) el cual consiste en una fuente ESI y un analizador de masas con triple cuadrupolo de iones, que fue controlado por el software de análisis 5.1. Los compuestos se identificaron por su tiempo de retención, espectros UV-vis y espectros de masa seguido de la comparación con una biblioteca de datos y estándares disponibles (Giampieri et al., 2014, pp. 3867-3876).

4.3.2. Análisis de antocianinas.

Para el análisis de antocianinas se utilizó una columna C-18 AQUA® (Phenomenex) de fase inversa (5 µm, 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a 35 ° C. La fase móvil utilizada para el análisis consistió en (A) 0.1% ácido trifluoroacético y (B) acetonitrilo con el siguiente gradiente de elución: B isocrático 10% por 3 minutos, 10-15% por 12 minutos, 15% por 5 minutos, 15-18% por 5 minutos, 18-30% por 20 minutos, 30-35% por 5 minutos, y seguidamente se volvió a equilibrar la columna con las condiciones iniciales del disolvente. La velocidad de flujo utilizada fue de 0,5 ml min. La doble detección en línea se llevó a cabo en el DAD utilizando longitudes de onda de 280 y 520 nm, mientras que la detección de masas (MS) fue operada en el modo de iones positivos. Los espectros se registraron entre los pesos moleculares de 100 a 1500 m/z. Aire de grado cero sirvió como gas nebulizador (40 psi) y como gas turbo (600 °C) para secado (50 psi). El nitrógeno sirvió como gas de colisión (alto). El detector MS fue programado para realizar una serie de dos análisis consecutivos, un escaneo completo de alta sensibilidad (MS mejorada, EMS) y un análisis de ion de producto mejorado (EPI) para obtener el patrón de fragmentación del ion principal. Los parámetros del modo MS fueron los siguientes: ion spray tensión 5000 V, potencial de desconexión (DP) 41 V, entrada potencial (EP) 7,5 V y energía de colisión (CE) 10 V. Las configuraciones del modo EPI fueron iguales al anterior modo descrito más una propagación de la energía de colisión (CES) 0 V (Giampieri et al., 2014).

4.3.3. Análisis de flavonoides y otros derivados fenólicos.

Para el análisis de flavonoides y otros derivados fenólicos se utilizó una Columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2.7 µm, 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a 35 ° C. Los solventes utilizados fueron: (A) 0,1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo utilizados en un gradiente de elución isocrático del solvente B correspondiente a un 15% por 5 minutos, 15-20% por 5 minutos, 20-35% por 10 min, 35-50% por 10 minutos, 50-60% por 5 minutos y 60% por 5

minutos. Posteriormente se volvió a equilibrar la columna a las condiciones iniciales del solvente. El flujo fue de 0.5 mL min⁻¹. La doble detección en línea se llevó a cabo en el DAD a las longitudes de onda de 280, 330 y 370 nm y en la MS operaba en el modo de ion negativo. Los espectros fueron registrados entre las masas de 100 a 1500 m/z. Aire de grado cero sirvió como el gas nebulizador (30 psi) y como gas turbo (400 ° C) para secado del solvente (40 psi). El nitrógeno sirvió como gas de colisión (medio). Ambos cuádrupolos se establecieron en la unidad de resolución y análisis del EMS. Los parámetros del EMS fueron: voltaje de pulverización de iones 4500 V, DP -50 V, EP -6 V, CE -10 V y potencial de salida de celda (CXP) -3 V, mientras que los ajustes de EPI fueron: DP-50 V, EP-6 V, CE-25 V y CES 0 V (Giampieri et al., 2014).

4.4 Extracto metanólico.

4.4 Extracto metanólico.

El extracto metanólico se realizó en base a la técnica previamente descrita por Batista et al., (2017). Se pesó en un vaso de precipitación cubierto por papel aluminio 1 g de muestra liofilizada y se aforó a 10 ml con metanol/agua (80:20 v/v). Posteriormente se sometió la mezcla a agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la hora se colocó la mezcla en tubos falcón y se centrifugaron (Eppendorf/Centrifuge 5804 R) por 10 minutos a 1000 rpm dos veces. El sólido obtenido fue lavado varias veces hasta que la solución de extracción apareciera incolora. Seguidamente usando un filtro jeringa se filtró todo lo recuperado y se almacenó en frascos ámbar a -20°C.

A partir de este extracto se realizaron los análisis de determinación de fenoles, flavonoides, antocianinas y análisis de antioxidantes (descrito en la sección 4.8). Para cada análisis se tomaron tres muestras del extracto.

4.4.1 Determinación de Fenoles

La determinación del contenido de fenoles se realizó siguiendo la técnica descrita por Singleton et al., (1998). Para el ensayo se utilizaron cubetas plásticas donde se colocaron 100 μL de la muestra diluida (1:5 v/v) /blanco/estándar además de 500 μL del reactivo de Folin Ciocalteu (sigma-Aldrich) realizando el ensayo por triplicado. Seguidamente se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 400 μL de carbonato de sodio. Se incubó la solución en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas y se procedió a la medición en espectrofotómetro (Shimadzu/UVmini-1240) a 760 nm contra el blanco el cual contenía agua destilada en lugar de muestra. Previamente se realizó una curva de calibrado partiendo de una solución madre de ácido gálico (6 mM) utilizando 0.1g ácido gálico (Lobachemie) disuelto en 1ml de metanol y aforado a 100ml de agua destilada para realizar estándares con concentraciones de 3mM a 0.1875 mM. Los resultados de concentración de fenoles fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por g de FW (fruto fresco).

4.4.2 Determinación de Flavonoides

La determinación del contenido de flavonoides se realizó siguiendo la técnica descrita por Muñoz et al., (2007). El procedimiento fue realizado en placas de 96 pocillos. Se tomaron 20 μL de la muestra sin dilución y se añadieron 100 μL de agua destilada. Seguidamente se adicionaron 6 μL de una solución al 5% de nitrito de sodio (5%) (Sigma- Aldrich) y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 6 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 12 μL de la solución de cloruro de aluminio hexahidratado (Lobachemie) al 10% preparado en metanol y se esperó 5 minutos. Finalmente se añadieron 40 μL de hidróxido de sodio 1M y 22 μL de agua destilada. Se midió la absorbancia de la solución en lector de placas (Biotek/Synergy) a 510 nm contra el blanco que contenía agua destilada en lugar de muestra. Previamente se realizó una curva de calibrado partiendo de una solución madre de catequina (1 mM)

utilizando 0,0308 g de catequina (Cayman) disuelto en 100 ml de agua destilada para realizar estándares de concentraciones de 2 mM a 0.25 mM. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de catequina por g de FW.

4.4.3 Determinación de antocianinas.

La determinación del contenido de antocianinas se realizó en base a la metodología descrita por Pantelidis et al.(2007). Previamente se realizaron dos soluciones tampón. El primero con cloruro de potasio (Sigma- Aldrich) a un pH de 1 a una concentración 0.025 M y el segundo con acetato de sodio trihidratado (Fisher Scientific) a un pH de 4.5 y una concentración de 0.4M. Seguidamente se procedió a realizar dos diluciones (1:10 v/v) por tampón para cada muestra de mora. La medición se realizó en cubetas de plástico añadiendo 100 µl de muestra y 900 µl de solución tampón 1 y las mismas proporciones en una segunda cubeta con el tampón 2. Se debió realizar dos blancos uno con cada tampón en las cuales se colocaron agua destilada en lugar de muestra y se leyeron cada una a 500 y 700 nm. Previo a la medición de las muestras se realizó una curva de calibrado con una solución madre de 1mg de pelargonidina (Sigma-Aldrich) en 1 ml de metanol grado análisis para proceder a la preparación de estándares de concentraciones de 5mg a 200 mg.

Los resultados fueron obtenidos tras la aplicación de la ecuación:

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

Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de pelargonidina por mg de FW.

4.5 Determinación de Taninos.

La determinación del contenido de taninos se realizó a partir de la técnica descrita por la norma 9648 ISO (1988). Se tomaron 0.05g de tejido liofilizado de

mora y se añadió 1 ml de N-N dimetilformamida (Sigma- Aldrich) llevando la solución a agitación por 60 minutos. Seguidamente se centrifugo a 1000 gravedades durante 10 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se colocaron 2,16 µl de muestra diluida (1:2 v/v) en una placa de 96 pocillos, 143,8 µl de agua, 27 µl de solución amoniacal y 27 µl de solución de citrato férrico dejando reposar la placa por 10 minutos en la oscuridad. Finalmente se procedió a la medición a 525 nm usando agua destilada en lugar de la muestra como blanco. Previamente se realizó una curva de calibrado partiendo de una solución madre de ácido tánico al 0,1% (2 mg de ácido tánico (Sigma-Aldrich) en 2ml de agua destilada) para realizar estándares de concentraciones de 0.1 mg/ml a 0.02 mg/ml. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de ácido tánico por g de FW. Este análisis se realizo por triplicado a partir del liofilizado inicial.

4.6 Extracto rico en β -Caroteno.

El extracto rico en β -Caroteno se realizó siguiendo la técnica descrita por Hernández et al. (2011). Se pesaron 5 g de mora liofilizada y se colocó en un frasco ámbar boeco de 250 ml con 100 ml de cloroformo y se dejó reposar durante 24 horas en la oscuridad. Después de este proceso, la muestra se filtró mediante papel filtro y se realizó la extracción de cloroformo en rotavapor, con la finalidad de evaporar cualquier residuo de cloroformo que esté en la muestra. Una vez que la muestra se ha secado, se colocaron 3 g de fruto extraído y se adicionaron 100 ml de hidróxido de potasio metanólico al 5% en un balón de destilación de 250 ml. Con estos reactivos, se realizó la saponificación utilizando el método de reflujo, a una temperatura de 50 °C durante 4 horas; el balón se tapó con papel aluminio durante el procedimiento.

Al terminar el proceso de saponificación, se dejaron enfriar los balones durante 30 minutos y se colocaron 100 ml de éter de petróleo (J.T Baker) con el fin de extraer el betacaroteno. Esta muestra se pasó a un embudo de separación y se

colocaron 100 ml de agua destilada, se agitó fuertemente y se dejó en reposo. Se separaron las fases, orgánica y acuosa, y se pasó a un balón de destilación la fase orgánica, la cual es donde se encuentran disueltos los carotenos. Esta solución obtenida, se colocó en el rotavapor a 40°C hasta que se evapore todo el solvente.

A partir del extracto obtenido se tomaron tres muestras para el análisis de determinación de β - caroteno mediante HPLC.

4.6.1 Determinación de β - caroteno mediante HPLC

La determinación del contenido de β - caroteno se realizó siguiendo la técnica descrita por Hernández, Aldana, & Rodríguez, (2011). Se colocaron 20ml de fase móvil, compuesta de metanol-isopropanol en una proporción 35:65 (v/v), en el extracto rico en carotenos obtenidos del rotavapor. Esta solución se filtró con un filtro jeringa de 0,45 μ m y se colocó en viales de HPLC.

Para poder realizar la cuantificación de los picos obtenidos mediante este análisis, se realizó una curva de calibración de β -caroteno en el rango de concentración de 0,05 – 10,0 mg/L (ppm). Para esta curva de calibración se utilizó como estándar el reactivo β -caroteno comercial (Sigma – Aldrich) el cual tiene 93% de pureza y 0% de humedad.

Los resultados fueron expresados en μ g de β - caroteno por 100g de FW.

Las condiciones en las que se operó el análisis por HPLC fueron:

- **Equipo:** HPLC (Agilent Technologies Series 1260)
- **Flujo:** 1.0 ml/min
- **Vol. Inyección:** 20 μ l
- **Temperatura:** Ambiente
- **Longitud de onda:** 450 nm
- **Tiempo de corrida:** 15 minutos
- **Fase móvil:** Isopropanol: Metanol (65:35)
- **Columna:** Eclipse Plus C18 5 μ m 4.6 x 250 mm
- **Modo de elución:** Dinámico (Mezcla de dos líneas)

4.7 Determinación de vitamina C.

La determinación del contenido de vitamina C se realizó siguiendo la técnica descrita por The United States Pharmacopeial Convention, (2015). Se pesaron 50 mg de mora liofilizada y se añadieron 10 ml de diluyente compuesto por ácido metafosfórico (Sigma- Aldrich) y ácido acético glacial (Merk Millipore) en una proporción de 73:84 (p/v), en un balón aforado cubierto con papel aluminio de 25 ml y se llevó a ultrasonido en baño de hielo durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos el balón. Después de que la muestra fue sometida a ultrasonido, se dejó reposar el balón hasta que llegue a la temperatura ambiente y se aforó con el diluyente de muestra. La solución obtenida se filtró con un filtro jeringa de 0.45 μ m y se colocó en viales de HPLC por triplicado.

Para poder realizar la cuantificación de los picos obtenidos mediante este análisis, se realizó una curva de calibración en el rango de concentración de 0,05 – 10,0 mg/L (ppm). Para esta curva de calibración se utilizó como estándar el reactivo ácido ascórbico (Chem Service), el cual tiene 99,5% de pureza y 0% de humedad (Benvenuti, Pellati, Melegari, & Bertellil, 2004).

Los resultados fueron expresados en mg de ácido ascórbico por 100g de FW.

Las condiciones en las que se operó el análisis por HPLC fueron:

- **Equipo:** HPLC (Agilent Technologies Series 1260)
- **Flujo:** 1.0 ml/min
- **Vol. Inyección:** 20 μ l
- **Temperatura:** Ambiente
- **Longitud de onda:** 245 nm
- **Tiempo de corrida:** 20 minutos
- **Columna:** Eclipse Plus C18 5 μ m 4.6 x 150 mm
- **Fase móvil:** Sol. KH_2PO_4 50 mM pH 2.5
- **Modo de elución:** Dinámico (Mezcla de dos líneas)

4.8 Determinación de la capacidad antioxidante.

4.8.1 Determinación mediante el método de FRAP.

La determinación de la capacidad de captación de radicales libres se determinó por el método de FRAP (*ferric reducing/antioxidant power*) siguiendo el procedimiento previamente descrito por Benzie et al., (1996). Se colocaron en una placa de 96 pocillos 180 μ l de solución FRAP, preparada el mismo día, y 20 μ l de muestra diluida (1:5 v/v) /estándar/blanco y seguidamente se midió a la absorbancia a 539 nm en un lector de placa (Biotek/Synergy) .Previamente se realizó una curva estándar partiendo de una solución madre de Trolox 5 Mm utilizando 0.313 g de Trolox (Sigma- Aldrich) disueltos en 25 ml de etanol absoluto para realizar estándares de concentraciones desde 5 mM a 50 μ M. Paralelamente se realizó también una curva estándar de amonioferrosulfato (1 mM) para lo cual se tomaron 0.0196 g de amonioferrosulfato y se diluyeron en 50 ml de agua destilada para realizar estándares de concentraciones desde 1

mM a 50 μ M. Los resultados fueron expresados en mg de trolox por mg de FW y mg de amonioferrosulfato por mg de FW respectivamente.

4.8.2 Capacidad de captar radicales libres por el método de DPPH.

La determinación de la capacidad de captación de radicales libres mediante el método de DPPH se realizó siguiendo la técnica descrita por Bondet, et al., (1997). De manera preliminar se realizó una curva de calibrado de trolox con concentraciones desde 5 a 500 μ M. Para el ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos en la cual se colocó para realizar el blanco 110 μ L de etanol / agua (7:3 v/v), 10 μ L de etanol absoluto y 80 μ L del reactivo DPPH 0,2 mM (Alpha Aesar). Para la lectura de las muestras se colocaron 110 μ L de etanol / agua (7:3 v/v), 10 μ L de la muestra en dilución (1:10 v/v) y 80 μ L de DPPH 0,2 mM. Todo lo anterior fue realizado por triplicado. Posteriormente se dejó incubar la placa por 15 min para medir su absorbancia a 517 nm. Para la obtención de resultados se utilizó la siguiente ecuación:

$$DPPH \text{ scavenging activity } (\%) = \left(1 - \frac{Abs \text{ muestra} - Blanco \ 2}{Blanco \ 1}\right) * 100$$

(Ecuación 2)

De esta manera los resultados obtenidos fueron expresados en μ mol de trolox por g FW.

4.9 Análisis estadístico de resultados.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EE. UU.). Los datos entre los diferentes grupos se analizaron utilizando ANOVA de una vía y la prueba de Turkey; donde el valor

P <0.05 fue considerado como significativo. Los resultados de los análisis se expresaron como media \pm desviación estándar (M \pm DS).

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Caracterización química de moras andinas (*Rubus glaucus* Benth).

Los resultados obtenidos de los análisis de la caracterización química se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.

Resultados del análisis químico en moras andinas (Rubus glaucus Benth).

| Parámetro | Zona de colecta | | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | Ambato | Cayambe | Machachi |
| Fenoles totales (mg GAE /g FW) | 2.30 \pm 0.10 ^a | 2.68 \pm 0.09 ^a | 2.99 \pm 0.09 ^a |
| Flavonoides (mg Cat/g FW) | 1.20 \pm 0.13 ^a | 1.21 \pm 0.20 ^a | 1.35 \pm 0.014 ^a |
| Antocianos (mg PgEq /g FW) | 0.45 \pm 0.01 ^a | 0.51 \pm 0.01 ^a | 0.52 \pm 0.01 ^a |
| B caroteno (μg/100g) | 81.16 \pm 1.24 ^a | 101.64 \pm 0.35 ^b | 47.55 \pm 0.07 ^c |
| Vit C (mg/100g) | 105.96 \pm 1.0 ^a | 92.53 \pm 1.95 ^b | 80.31 \pm 0.24 ^c |
| Taninos (mg ac tánico/g FW) | 0.98 \pm 0.12 ^a | 0.98 \pm 0.11 ^a | 0.90 \pm 0.06 ^a |

Nota: Los datos represetan la media \pm la desviación estándar (N=3)

El contenido de fenoles totales estuvo dentro del rango de 2.30 a 2.99 mg GAE/g FW sin existir deferencias significativas entre los resultados de las tres localidades (Tabla. 6), estos valores coinciden con el rango reportado en moras

tanto comerciales como nativas de Arkansas (Estados Unidos) cuyo rango de fenoles totales fue de 1.14 a 10.56 mg GAE/g FW (Kaume et al., 2012) y con los reportes en fresas que muestran concentraciones de 2.52 mg GAE/g FW (Gasparrini et al., 2017), no obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio son menores al ser comparados con los frutos rojos procedentes de Alaska cuyos valores corresponden de 10.40 a 20.62 mg GAE/g FW en frambuesas y de 6.24 mg GAE/g FW en arándanos (Grace, Esposito, Dunlap, & Lila, 2013; Sariburun, Şahin, Demir, Türkben, & Uylaşer, 2010, pp. 1- 11). En el caso de los flavonoides los resultados obtenidos tampoco tuvieron diferencia significativa entre las localidades (Tabla 6), obteniendo valores de 1.20 mg Cat/g FW a 1.35 mg Cat/g FW, los valores obtenidos son similares a los reportados en frutos rojos estudiados en Bursa (Turquía) en los cuales se encontraron moras con concentraciones de 0.51 a 0.82 mg Cat/g FW y frambuesas con concentraciones de 3.82 a 4.11 mg Cat/g FW (Sariburun et al., 2010, pp. 328-335) a su vez son similares con el valor reportado en fresas correspondiente a 0.66 mg Cat/g FW (Gasparrini et al., 2017, pp. 1-10) .

En el caso de la cuantificación de antocianos se revelo un rango de 0.45 a 0.52 mg PgEq/g FW, sin diferencias significativas (Tabla 6), estos resultados son mayores a los reportados en fresas provenientes de Ancona (Italia) que poseen una concentración de antocianos de 0.253 mg PgEq/g FW (Giampieri, Alvarez-Suarez, & Battino, 2014, pp. 3867- 3876). El β -caroteno como uno de los pigmentos presentes en frutos rojos fue encontrado en un rango de 47.55 a 101.64 μ g/100g, los valores obtenidos tuvieron diferencias significativas entre las concentraciones de cada sector (Tabla. 6), siendo la mora con mayor concentración de β carotenos la proveniente de Cayambe y la de menor contenido la proveniente de Machachi. Los resultados evidenciados fueron mayores que en los reportados en fresas de Ancona (Italia) con una concentración de 2.5 ± 0.05 μ g/100g FW (Giampieri, Alvarez-Suarez, Mazzoni, et al., 2014, pp. 1939- 1948).

Otra de las sustancias cuantificadas en las moras estudiadas fue la vitamina C de la cual se obtuvieron concentraciones en un rango de 80.31 a 105.96 mg/100g FW teniendo diferencias significativas entre las concentraciones de las moras de cada sector (Tabla 6), siendo la mora con mayor concentración de vitamina C la procedente de Ambato y la de menor concentración la de Machachi, los valores obtenidos en este análisis son mayores a los reportados en otras moras andinas en las cuales se establece una concentración de 21 mg/100g de FW (Carrillo-Perdomo et al., 2015, pp. 49-69) y en fresas de Ancona (Italia) cuyo valor corresponde a 58.80 mg/100g de FW (Giampieri, Alvarez-Suarez, & Battino, 2014, pp. 3867- 3876); en el caso de las moras es importante destacar que existen factores que influyen en la concentración de vitamina C en el fruto, tales como su maduración, reportándose valores de 124,38 a 138,15 mg/100g FW cuando están verdes, de 182,60 a 239,9 mg/100g FW cuando están rojas y en su etapa de sobre maduración valores de 57,89 a 96,05 mg/100g FW (García, Bravo, García, Ruiz, & Budovalchew, 2015, pp. 329-334). En el caso de taninos no se encontraron diferencias significativas en el contenido de las diferentes regiones (Tabla. 6) estando los valores obtenidos en el rango de 0.90 mg ac tánico/g FW a 0.98 mg ac tánico/g FW, por otro lado los datos obtenidos no pudieron ser comparados con los reportados en bibliografía ya que no se tuvo acceso a reportes expresados en los mismos estándares que se ocuparon en este análisis, no obstante previamente han reportado taninos tales como elagitaninos con valores de 0,39 mg GAE/g FW en fresas de Ancona (Italia) (Giampieri, Alvarez-Suarez, Mazzoni, et al., 2014, pp. 1939- 1948)y en moras de Arkansas (Estados Unidos) un rango de 20 mg GAE/100g FW a 30 mg GAE/100g FW de ácidos elágicos (Kaume et al., 2012, pp. 5716-5727).

5.2 Identificación de los compuestos fenólicos de moras andinas (*Rubus glaucus* Benth).

Los resultados obtenidos de la identificación de los compuestos fenólicos de las moras andinas se muestran en la tabla 8.

La identificación de compuestos fenólicos en mora (Tabla 8) muestra la existencia de dos tipos de cianidinas como antocianinas predominantes en las moras estudiadas (*Figura 12*), estos compuestos están dentro de las antocianinas identificadas y reportadas en investigaciones previas en frambuesas y moras de Bursa (Turquía) en las que también se han encontrado presencia de pelargonidinas y malvidinas (Sariburun et al., 2010, pp. 328-335) sin embargo, en el caso de los reportes que involucran a las fresas de Ancona (Italia) se han identificado mayor cantidad de pelargonidinas que de cianidinas (Giampieri, Alvarez-Suarez, Mazzoni, et al., 2014, pp. 5716-5727).

Tabla 8.

Identificación tentativa de compuestos fenólicos de moras andinas (Rubus glaucus Benth).

| Número de pico | T _R ^a (min) | DAD ^b (nm) | MS ^c (m/z) | MS/MS ^d (m/z) | Identificación tentativa |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| An1 | 21.2 | 280, 518 | 727 | 595,449, 217 | Cianidina-pentosa-rutinoso |
| An2 | 22.3 | 280, 518 | 595 | 449, 287 | Cianidina-rutinoso |
| 1 | 6.1 | 282 | 171 | ---- | Deriv. ácido gálico |
| 2 | 8,1 | 276 | 247 | 139 | Der. ácido hidroxibenzoico |
| 3 | 8.9 | 288, 308sh | 147 | 103 | ---- |
| 4 | 12.4 | 226, 270sh | --- | ---- | ---- |
| 5 | 13.5 | 276 | 307 | 289, 185 | Epigallocatequina |

| | | | | | |
|----------|------|----------|-----|----------|-----------------------------------|
| 6 | 25.7 | ---- | 785 | 303 | Bis HHDP-glucose (elagitanino) |
| 7 | 28.1 | 254, 360 | 435 | 303 | Ácido elágico- pentosa |
| 8 | 29.4 | 254, 364 | 611 | 465, 303 | Quercetin rutinosido |
| 9 | 30.5 | 254, 354 | 611 | 479,303 | Metilquercetin hexosa-pentosa |

Nota:

^a Tiempo de retención expresado en minutos.

^b Absorbancia cuantificado en nanómetros.

^c Espectro de masas 1 expresado en unidades de masa/carga

^d Espectro de masas 2 expresado en unidades de masa/carga.

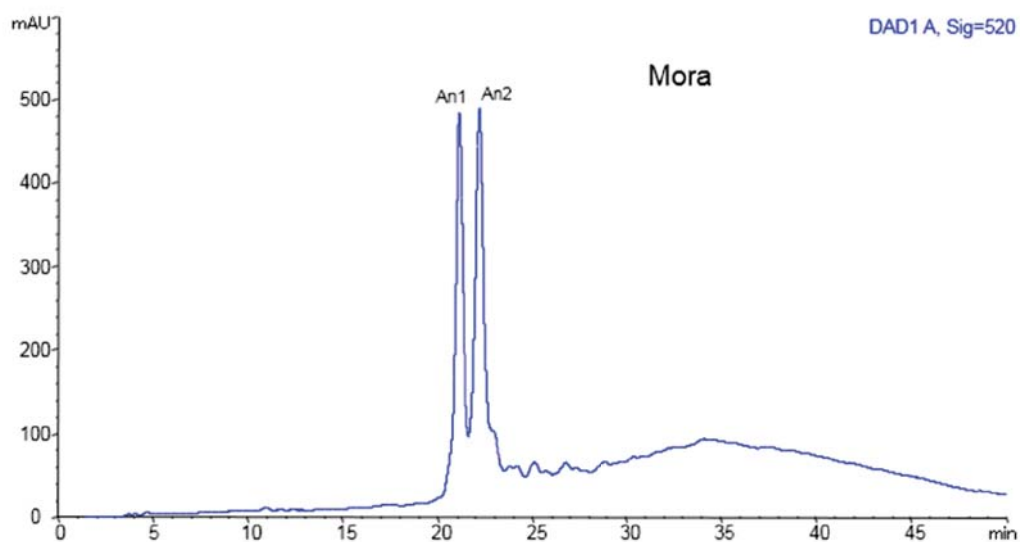


Figura 12. Longitud de onda de 520 para Antocianos.

De igual manera se identificaron los flavonoides tentativos existentes en las muestras estudiadas, demostrando la presencia de quercetina y ácido elágico (*Figura 13*), este resultado se contrasta con los reportes previos realizados en fresas donde encontraron quercetinas, ácidos elágicos y kaemferol (Giampieri, Alvarez-Suarez, Mazzoni, et al., 2014, pp. 5716-5727).

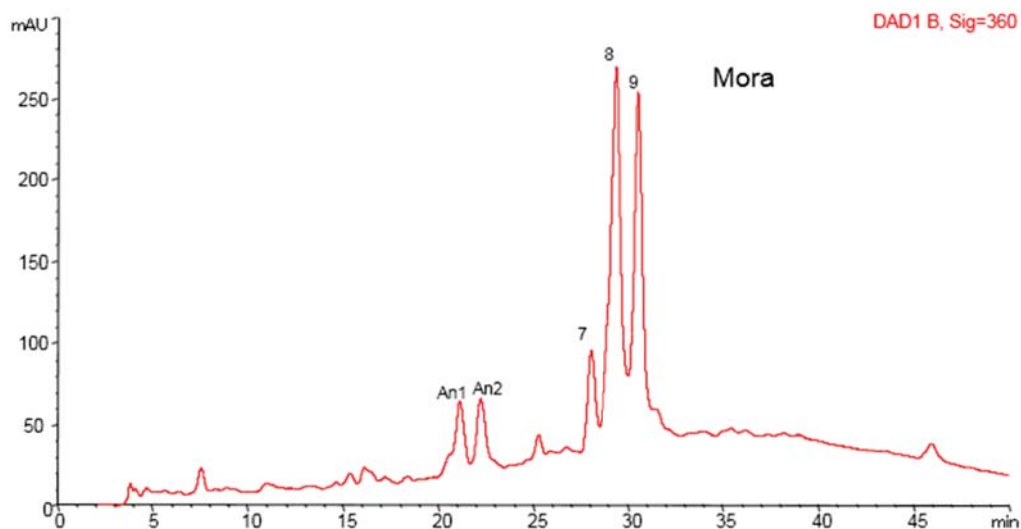


Figura 13. Longitud de onda de 360 para Flavonoides

Finalmente se identificaron los ácidos fenólicos (*Figura 14*) entre los cuales se encuentran los derivados de los ácidos gálicos e hidroxibenzóicos así como también otros compuestos reportados en moras nativas estudiadas en Polonia en las cuales se evidenciaron otros tipos de ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido cumárico, entre otros (Oszmiański et al., 2015, pp. 14540-

14553).

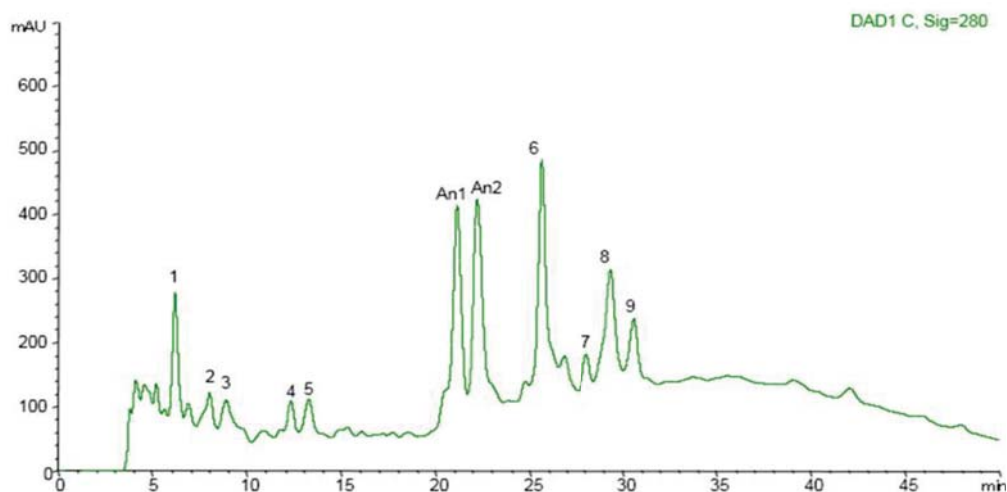


Figura 14. Longitud de onda de 280 para Ácidos Fenólicos

5.3 Capacidad antioxidante de moras andinas (*Rubus glaucus* Benth).

Los resultados muestran la capacidad antioxidante de las moras estudiadas mediante la evaluación realizada por dos mecanismos de acción: FRAP para determinar la capacidad reductora y DPPH para determinar la capacidad de captar radicales libres.

En la figura 15 se muestra el análisis mediante el método FRAP utilizando un estándar de trolox, los resultados demuestran que no existen diferencias significativas entre las moras de cada sector estudiado, cuyos valores obtenidos se encontraron en un rango de 98.23 $\mu\text{mol Trolox/g FW}$ a 109.45 $\mu\text{mol Trolox/g FW}$, no obstante, la capacidad reductora de las moras estudiadas es superior a las reportadas en fresas de Ancona (Italia) donde se muestra una concentración de $8.71 \pm 0.12 \mu\text{mol Trolox/g FW}$ (Romandini et al., 2013, pp. 169-179), así como también superan a moras andinas (*Rubus glaucus* Benth) de origen colombiano que reportan concentraciones de 45 $\mu\text{mol Trolox/g FW}$ (A. Garzón, Riedl, & Schwartz, 2009, pp. 227-232).

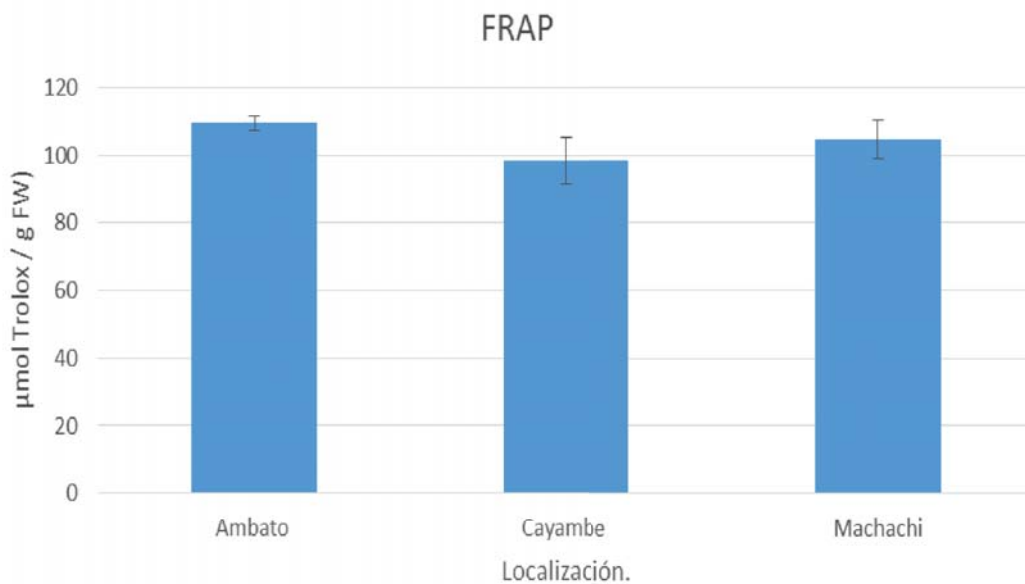


Figura 15. Cuantificación de la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP con estándar de trolox.

En el Ecuador se ha reportado la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP en capulí estudio del cual se obtuvo como resultado un valor de 12.65 $\mu\text{mol Trolox/g DW}$ (Alvarez-Suarez et al., 2017, pp. 46-52). También se utilizó el método FRAP con estándar de amonio ferro sulfato (Figura 16) con el cual los resultados fueron similares a los obtenidos con el estándar de trolox, es decir, sin diferencias significativas al encontrarse los datos en un rango de 175.31 $\mu\text{mol AFS Eq/g FW}$ a 196.35 AFS Eq /g FW . Los valores obtenidos en el estudio son cercanos a los valores reportados en arándanos de Alaska donde se registra $122,2 \pm 4,6 \mu\text{mol AFS Eq/gFW}$ (Grace et al., 2013, pp. 1-11), además superan significativamente los valores reportados de moras andinas de origen colombiano las que se encuentran en un rango de 52 a 82 $\mu\text{mol AFS Eq/g FW}$ (A. Garzón et al., 2009, pp. 227-232; Koca & Karadeniz, 2009, pp. 447-450).

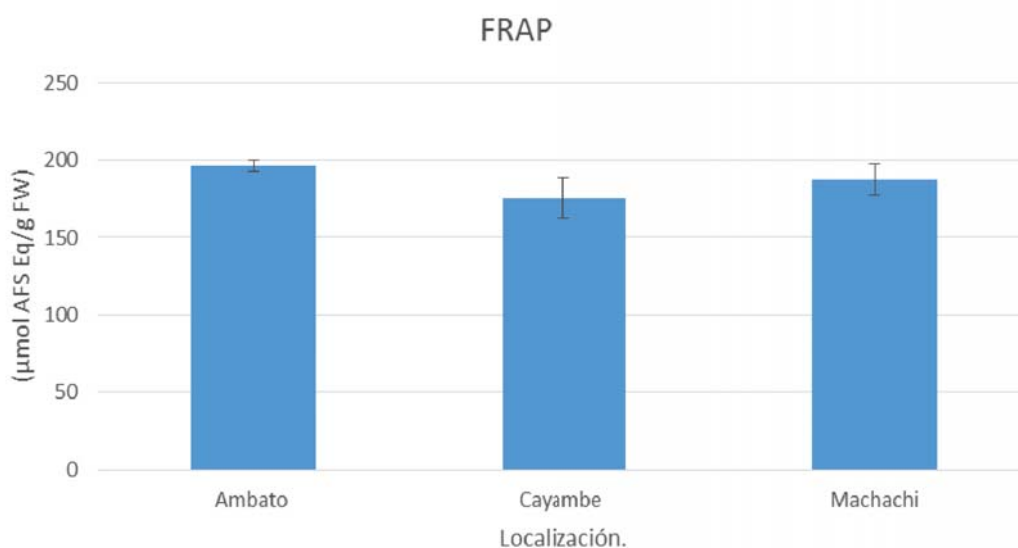


Figura 16. Cuantificación de la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP con estándar de amonioferrosulfato.

Finalmente, se evaluó la capacidad antioxidante mediante el mecanismo de acción de DPPH utilizando un estándar de trolox (Figura 17) para determinar la capacidad de captar radicales libres, los resultados estuvieron en un rango de 160.55 μmol de trolox/g FW a 147.98 μmol de trolox/g FW. Los valores obtenidos fueron significativamente superiores a los reportados en arándanos en los cuales se identificó un rango de 51.4 a 69.3 μmol de trolox/g FW (Grace et al., 2013, pp. 1-11) e incluso mayores a los reportados en fresas con un valor de 7.71 μmol de trolox/g FW (Gasparrini et al., 2017, pp. 1-10) y en bayas nativas del oeste de América del norte del género Mahonia en la que se reportan valores de 35.26 μmol de trolox/g FW (Coklar & Akbulut, 2017, pp. 166-174)

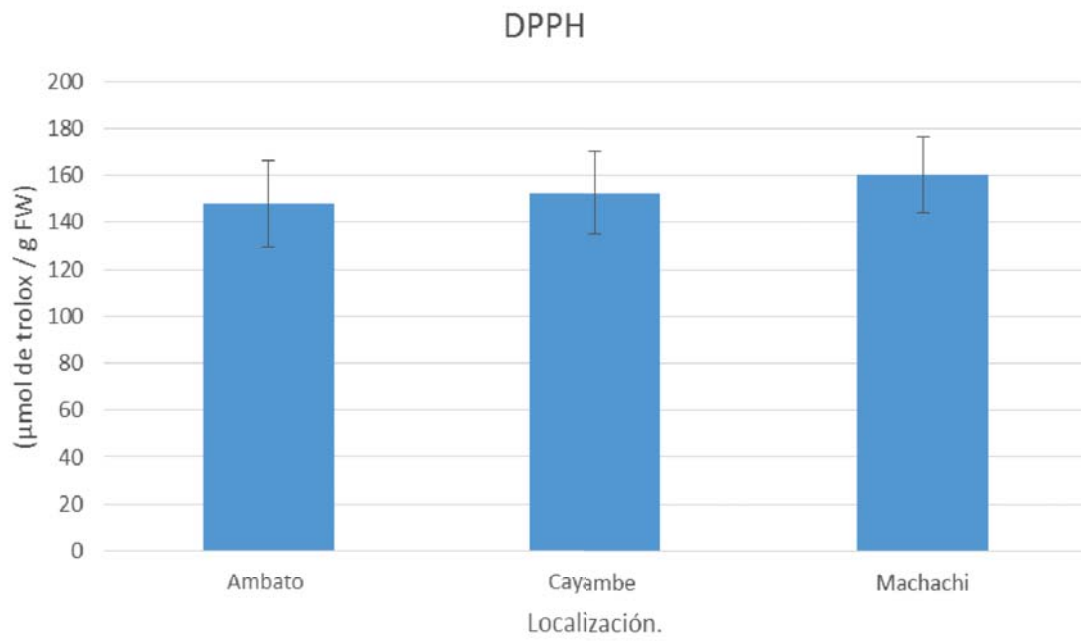


Figura 17. Cuantificación de la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH con estándar de trolox.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

6.1. Conclusiones.

Las muestras de cada sector muestran similitud en la concentración de composición química de fenoles, flavonoides, antocianos y taninos.

Las moras andinas estudiadas poseen una elevada concentración de vitamina C por lo cual estaría dentro de los frutos potenciales para mantener un elevado sistema inmunológico a través de su ingesta. Siendo las moras de Ambato las que revelan mayor concentración.

En los estudios de determinación de β - carotenos mostraron que la mora de Cayambe posee mayor contenido de este compuesto respecto a las otras dos estudiadas.

6.2. Recomendaciones.

Realizar pruebas in vitro en líneas celulares epidermicas para identificar la capacidad protectora de este fruto ante el daño causado por estrés oxidativo.

Investigar las enzimas involucradas en reacciones relacionadas con el estrés oxidativo e identificar los genes que influyen o se ven afectados directamente con la degeneración de células por estrés oxidativo.

La identificación de los compuestos polifenólicos presentes en las moras andinas estudiadas asientan bases para indagar individualmente cada sustancia y fruto como tratamiento preclínico de enfermedades inflamatorias o causadas por estrés oxidativo.

REFERENCIAS

- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., & Meza, J. (2011). Propiedades Funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 13(2), 16–21. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Alvarez-Suarez, J. M., Carrillo-Perdomo, E., Aller, A., Giampieri, F., Gasparri, M., González-Pérez, L., Battino, M. (2017). *Anti-inflammatory effect of Capuli cherry against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. Food and Chemical Toxicology*, 102, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.024>
- Alvarez, M. (2011). Taninos Y Flavonoides. Recuperado el 11 de Abril del 2017 de https://q-organicauce.wikispaces.com/file/view/TRABAJO+TANINOS+Y+FLAVONOIDES_Michelle+Alvarez.pdf
- Bach-Faig, A., Berry, E., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., Padulosi, S. (2011). *Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. Public Health Nutrition*, 14(12A), 2274–2284. <https://doi.org/10.1017/S1368980011002515>
- Barreno, E., Brugués, M., & Costa, M. (1997). *Botánica* (2º Edición). Madrid.
- Batista, Â., da Silva, J., Betim, C., Biasoto, A., Sawaya, A., Prado, M., & Júnior, M. (2017). *Red-jambo (Syzygium malaccense): Bioactive compounds in fruits and leaves. LWT - Food Science and Technology*, 76, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.013>
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., & Bertellil, D. (2004). *Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia*. Recuperado el 4 de Abril del 2017 de

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x/abstract>

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": *The FRAP Assay. Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Betancur, E., García, L., Barrera, E., & Quejada, O. (2015). Buenas Prácticas. Recuperado el 25 de Mayo del 2017 de http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/mora_enero_2015_liviano.pdf

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. *Free Radical Method. LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>

Carrillo-Perdomo, E., Aller, A., Cruz-Quintana, S. M., Giampieri, F., & Alvarez-Suarez, J. M. (2015). Andean berries from Ecuador: A review on Botany, Agronomy, Chemistry and Health Potential. *Journal of Berry Research*, 5(2), 49–69. <https://doi.org/10.3233/JBR-140093>

Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Recuperado el 15 de junio del 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>

Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. Recuperado el 12 de junio del 2017 de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf>

- Cerón, M. (2008). *Rubus fruticosus*. Recuperado el 15 de junio del 2017 de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/ceron_b_m/capitulo2.pdf
- 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>
- CORPEI. (2009). Perfil de mora, Recuperado el 15 de junio del 2017 de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>
- Corrales, L. C., & Ariza, M. M. M. (2012). Estrés oxidativo : origen , evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Recuperado el 15 de junio del 2017 de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>
- Del Rio, D., Rodriguez, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). *Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Diamanti, J., Mezzetti, B., Giampieri, F., Alvarez-suarez, J. M., Quiles, J. L., Gonzalez, A.,Gonza, A. (2014). *Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in Rats Is Efficiently Counteracted by Dietary Anthocyanin Differently Enriched Strawberry (Fragaria x ananassa Duch.)*. Recuperado el 23 de Agosto del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24580025>
- Dueñas, J., Naranjo, B., & Araujo, P. (2009). Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas., 1–8. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de

<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/877>

- García, M., Bravo, A., García, A., Ruiz, A., & Budovalchew, I. (2015). Contenido de vitamina C en dos variedades de moras durante la etapa de maduración. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(3), 329–334. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572015000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Garzón, A., Riedl, K., & Schwartz, S. (2009). *Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (Rubus glaucus Benth)*. *Journal of Food Science*, 74(3), 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01092.x>
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. Recuperado el 12 de Mayo del 2017 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2008000300002
- Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Battino, M. (2017). *Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages*. *Food and Chemical Toxicology*, 102(February), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.018>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J., & Battino, M. (2014). *Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity*. *Agricultural And Food Chemistry*, 3867–3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., González-Paramàs, A. M., Battino, M. (2014a). 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>

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, 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. Recuperado el 14 de Marzo del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24956972>

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). *The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health*. *Nutrition*, 28(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>

Grace, M. H., Esposito, D., Dunlap, K. L., & Lila, M. A. (2013). Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile , Antioxidant Capacity and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries Plants for Human Health Institute. Recuperado el 12 de Septiembre del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24219831>

Gualavisí, L. (2008). *Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina*. Recuperado el 12 de Septiembre del 2016 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/698/1/90047.pdf>

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. Recuperado el 27 de Septiembre del 2016 de <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/95>

- ISO. (1988). Cuantificación de flavonoides, taninos y esteroides en plantas medicinales de uso tradicional en Tabasco. Recuperado el 25 de Agosto del 2017 de <http://www.archivos.ujat.mx/dip/divulgacion%20y%20video%20cientifico%202008/DACB/ELobatoG%202.pdf>
- Jardín Botánico. (2017). *Rubus glaucus*. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de <http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/emblematicas/1-rubus-glaucus>
- Juranić, Z., & Žižak, Ž. (2005). Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*, 23(4), 207–211. <https://doi.org/10.1002/biof.5520230405>
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- Koca, I., & Karadeniz, B. (2009). *Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey*. *Scientia Horticulturae*, 121(4), 447–450. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.03.015>
- MAGAP. (2013). La Mora de Castilla. Recuperado el 7 de Abril del 2017 de <http://balcon.magap.gob.ec/mag01/magapaldia/HOMBRO%20A%20HOMBRO/manuales/Manual%20El%20cultivo%20de%20la%20mora.pdf>
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Recuperado el 25 de Enero del 2017 de <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004->

06222000000100001&script=sci_abstract

- Martínez, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica*, 13(33), 13–18. <https://doi.org/0122-1701>
- Moscoso, L. (2013). Medicina Ancestral Saberes para curar el cuerpo y alma.
- Muñoz, O., Copaja, S., Speisky, H., Peña, R. C., & Montenegro, G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles Chilenas e índice antioxidante. *Quimica Nova*, 30(4), 848–851. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400017>
- Oro, J., & Donnamaría, C. (2006). Acción farmacológica, biofísicoquímica y estructura dinámica de la vitamina C. Recuperado el 3 de Noviembre del 2016 de http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/1/LAJOP_25_1_6_1_508R9MF3CR.pdf
- Oszmiański, J., Nowicka, P., Teleszko, M., Wojdyło, A., Cebulak, T., & Oklejewicz, K. (2015). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14540–14553. <https://doi.org/10.3390/ijms160714540>
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G., & Diamantidis, G. (2007). *Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries.* *Food Chemistry*, 102(3), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021>
- Ramos, Nieto, & Córdova. (2016). Requerimientos del cultivo. *Iniap*, 12, 21. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Romandini, S., Mazzoni, L., Giampieri, F., Tulipani, S., Gasparrini, 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>
- Sánchez, V., & Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex, 20(3)*, 161–168. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de <http://www.medicenlinea.com.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>
- Sandoval, S. (2010). Cuantificación de Ácido Ascórbico (Vitamina C) en Néctares de Melocotón y Manzana Comercializados en Supermercados de la Ciudad Capital, (Vitamina C), 52. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2987.pdf
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, 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>
- Schreckinger, M. E., Lotton, J., Lila, M. A., & Mejia, E. (2010). *Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization*, 233–246. Recuperado el 24 de Marzo del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170356>
- Serra, H., & Cafaro, T. (2007). Ácido ascórbico : desde la química hasta su crucial función protectora en ojo Ascorbic acid : from chemistry to its crucial R esumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 41(4)*, 525–532. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v41n4/v41n4a10.pdf>
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela, R. (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)

Tetteh, M. (2012). ¿ Qué es el Estrés Oxidativo ? *Environmental Health Fact Sheet*, 2. Recuperado el 27 de Junio del 2017 de <http://ehscc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf>

The United States Pharmacopeial Convention. (2015). Cuantificación de vitamina C. Recuperado el 17 de Junio del 2017 de <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/handle/123456789/806>

Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). Carotenoides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Urango, L., Montoya, G., Cuadros, M., Henao, D., Zapata, P., López, L., ... Gómez, B. (2008). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 11(1), 124–4108. Recuperado el 22 de Junio del 2017 de <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/nutricion/article/view/9389>

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J., & Bagchi, D. (2007). *Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6), 675–683. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>

Zapata, L., Heredia, A., Quinteros, C., Malleret, A., Clemente, G., & Cárcel, J. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. Recuperado el 25 de Abril del 2017 de <http://www.pcient.uner.edu.ar/index.php/cdyt/article/view/33>

