

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



**Separación bioguiada de extractos orgánicos de *Macleania rupestris* (Joyapa) y  
evaluación de su potencial nutracéutico.**

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Bioquímica Farmacéutica.

**AUTORA:**

Jimena Guadalupe Cordero Machuca.

C.I.: 0104673256

**DIRECTORA:**

María Elena Cazar Ramírez. PhD.

C.I.: 0602243800

**CUENCA – ECUADOR**  
**2018**

## RESUMEN

*Macleania rupestris* Kunth es una especie endémica andina localizada mayoritariamente entre la zona geográfica de Colombia y Ecuador. Actualmente se reportan en la literatura pocos trabajos sobre la química y bioactividad de esta especie. El objetivo del presente trabajo fue realizar una investigación sobre la actividad antioxidant y antimicrobiana en fraccionamiento bioguiado que justifique la actividad biológica de *M. rupestris*. Para el efecto se prepararon extractos orgánicos por Soxhlet y maceración. El fraccionamiento fue realizado aplicando cromatografía en columna abierta y bajo presión. Para la evaluación de la actividad antioxidant se aplicó el método de captura del radical libre ABTS, mientras que para la determinación de la actividad antimicrobiana se usó el método de microdilución en placa.

Los rendimientos de obtención de extractos mostraron la eficiencia del método Soxhlet sobre el método de maceración. No obstante la bioactividad del extracto *M. rupestris* obtenido por maceración fue superior al extracto Soxhlet. Este extracto presenta una dosis inhibitoria menor (IC 50 2.83 mg/ml) y un mayor porcentaje de atrapamiento del radical libre ABTS a una concentración más baja (3.125 mg/ml). Luego de la separación del extracto en fracciones por permeación en columna de sílica y posterior ensayo antioxidant, se demostró que la actividad antioxidant presentada por los extractos orgánicos se concentró en las fracciones más polares. Este resultado implica que los metabolitos antioxidantes de *M. rupestris* son de naturaleza polar. Los extractos ensayados no presentan actividad antioxidant ante *Stafilococo aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Los resultados obtenidos permiten evidenciar el potencial de *M. rupestris* como fuente de metabolitos antioxidantes y se sugiere continuar con el estudio de la especie para llegar a caracterizar los metabolitos bioactivos.

**Palabras clave:** *Macleania rupestris*, actividad antioxidant, actividad antimicrobiana, cromatografía en columna, fraccionamiento bioguiado.

## ABSTRACT

*Macleania rupestris* Kunth is an endemic species mostly located in the Andean region of Colombia and Ecuador. Currently, there is little information about its chemistry and bioactivity. The purpose of this study was to carry out an analysis of the antioxidant and antimicrobial activity of *M. rupestris* by using a bioguided fractionation that could justify its biological activity. For this effect, organic extracts were prepared using Soxhlet and maceration methods. The fractionation was carried out by applying open column chromatography and under pressure column chromatography. For the evaluation of the antioxidant activity, the ABTS free radical capture method was applied, whereas the micro-dilution plate technique was used to determine the antimicrobial activity.

The obtained extracts yield showed higher efficiency of the Soxhlet method over the maceration method. However, the bioactivity of *M. rupestris* extract obtained by maceration was higher than the Soxhlet extract. After the fractionation of the extract by permeation in a silica column and the subsequent antioxidant test, it was shown that the antioxidant activity presented by the organic extracts was concentrated in the most polar fractions. This result implies that the antioxidant metabolites of *M. rupestris* are polar. The tested extracts did not show antioxidant activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The results show the potential of *M. rupestris* as a source of antioxidant metabolites, so it is recommended to continue with the study of this species in order to characterize its bioactive metabolites.

**Key words:** *Macleania rupestris*, antioxidant activity, antimicrobial activity, column chromatography, bioguided fractionation.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional</b> .....	9
<b>Cláusula de Propiedad Intelectual</b> .....	10
<b>DEDICATORIA</b> .....	11
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>I. MARCO TEÓRICO</b> .....	15
1.1    Familia Ericaceae, características .....	15
1.2    Macleania rupestris, características .....	15
1.2.1    Uso de los frutos de <i>Macleania rupestris</i> .....	16
1.3    Extracción .....	16
1.3.1    Métodos de extracción .....	17
1.3.1.1    Extracción por método Soxhlet .....	17
1.3.1.2    Extracción por Maceración .....	18
1.4    Separación de compuestos bioactivos .....	19
1.4.1    Cromatografía .....	20
1.4.1.1    Cromatografía en Capa Fina .....	20
1.4.1.2    Cromatografía en columna abierta por gravedad .....	22
1.4.1.3    Cromatografía en columna bajo presión .....	23
1.5    Alimentos Funcionales .....	25
1.6. Actividad Antioxidante.....	25
1.6.1    Compuestos antioxidantes en plantas medicinales .....	26
1.6.2    Métodos de determinación de actividad antioxidante .....	27
1.6.2.1    Método ABTS .....	27
1.6.3    Actividad Antimicrobiana.....	28
1.6.3.1    Métodos de determinación de actividad antimicrobiana .....	29
1.6.3.1.1    Método de dilución de placas .....	29
<b>II. METODOLOGÍA</b> .....	31
2.1 Preparación del material vegetal.....	31
2.2 Obtención de extractos.....	31
2.2.1    Método de Soxhlet .....	31

2.2.2 Maceración.....	32
2.3 Fraccionamiento del extracto.....	33
2.3.1 Fraccionamiento en columna bajo presión.....	33
2.3.2 Fraccionamiento en columna abierta por gravedad.....	35
2.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el método ABTS .....	37
2.4.1 Determinación cualitativa de actividad antioxidante.....	37
2.4.2 Determinación cuantitativa de actividad antioxidante .....	38
2.5 Análisis Estadístico .....	39
2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de dilución en micro placa .....	39
<b>III. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
3.1 Rendimiento de los extractos .....	40
3.2 Fraccionamiento de los extractos de <i>M. rupestris</i> .....	41
3.2.1 Rendimiento de las fracciones .....	41
3.2.2 Identificación de patrón cromatográfico de fracciones y extractos.....	43
3.4 Estudio de Bioactividad de <i>M. rupestris</i> .....	47
3.4.1 Actividad antioxidante por el método ABTS.....	47
3.4.1.1 Análisis Cualitativo.....	47
3.4.1.2 Análisis Cuantitativo .....	47
3.4.2 Actividad antimicrobiana por el método de dilución en placa.....	50
<b>IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
4.1 Conclusiones .....	52
4.2 Recomendaciones .....	53
<b>V. REFERENCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## Indice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diferentes tipos de adsorbentes usados para separar varios compuestos. . .	21
<b>Tabla 2.</b> Proporciones del sistema de solventes usadas para cada uno de las fracciones obtenidas. ....	35
<b>Tabla 3.</b> Proporciones del sistema de solventes usado para cada una de las fracciones obtenidas al final del fraccionamiento. ....	37
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento de los extractos de <i>M. rupestris</i> obtenidos por los métodos de Soxhlet y maceración.....	40
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento de las fracciones de los extractos (método Soxhlet y maceración) obtenidas mediante el uso de columnas bajo presión. ....	41
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento del Fraccionamiento del extracto obtenido por el método de maceración, mediante el uso de columna abierta por gravedad.....	42
<b>Tabla 7.</b> Valores de Rf obtenidos en placa resumen del fraccionamiento en columna bajo presión. Extracto por el método de Soxhlet. ....	44
<b>Tabla 8.</b> Valores de Rf obtenidos en placa resumen del fraccionamiento en columna bajo presión. Extracto por el método de maceración.....	44
<b>Tabla 9.</b> Valores de Rf obtenidos en placa resumen del fraccionamiento en columna abierta. Extracto por el método de maceración .....	44
<b>Tabla 10.</b> Análisis Cualitativo de Actividad antioxidante de los extractos obtenidos por los métodos Soxhlet y maceración.....	47
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de atrapamiento del ion estable ABTS en extractos totales y fracciones de los extractos metanólicos de <i>M. rupestris</i> .....	48
<b>Tabla 12.</b> Valores de IC 50 para extractos (obtenidos por Soxhlet y maceración) y fracciones positivas a actividad antioxidante.....	49

## Índice de ilustraciones

<b>Ilustración 1.</b> Planta de Macleania rupestris.....	16
<b>Ilustración 2.</b> Aparato de extracción Soxhlet .....	18
<b>Ilustración 3.</b> Diagrama de extracción y separación de los componentes que forman parte de un extracto total.....	19
<b>Ilustración 4.</b> Equipo para Cromatografía en Columna por gravedad.....	23
<b>Ilustración 5.</b> Equipo para realizar cromatografía al vacío.....	24
<b>Ilustración 6.</b> Equipo de Soxhlet usado durante para la obtención del extracto metanólico de M. rupestris. ....	32
<b>Ilustración 7.</b> Recipiente usado durante el proceso de maceración .....	32
<b>Ilustración 8.</b> Rotavapor utilizado durante el proceso de concentración de los extractos .....	33
<b>Ilustración 9.</b> Equipo de Cromatografía en Columna Bajo presión durante el proceso de empaquetado. ....	34
<b>Ilustración 10.</b> Columna para fraccionamiento bajo presión con extracto sembrado (cabeza) .....	34
<b>Ilustración 11.</b> Columna abierta usada para el fraccionamiento bajo gravedad.....	36
<b>Ilustración 12.</b> Rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna bajo presión (extracto Soxhlet y maceración) y por cromatografía en columna abierta (extracto maceración). Se representan solamente las fracciones con polaridades comparables.....	43
<b>Ilustración 13.</b> Placa resumen del fraccionamiento realizado en columna bajo presión. Extracto obtenido por el método de Soxhlet. ....	46
<b>Ilustración 14.</b> Placa resumen del fraccionamiento realizado en columna bajo presión. Extracto obtenido por el método de maceración.....	46
<b>Ilustración 15.</b> Placa resumen del fraccionamiento realizado en columna abierta por gravedad. Extracto obtenido por el método de maceración. ....	46

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Fruto de <i>M. rupestris</i> . <b>A:</b> Fruto liofilizado. <b>B:</b> Fruto pulverizado.....	62
<b>Anexo 2.</b> Fraccionamiento en Columna abierta bajo gravedad.....	62
<b>Anexo 3.</b> Fracciones obtenidas después de la aplicación de la Cromatografía en Columna bajo Presión. Fracciones de 1 a 6 .....	62
<b>Anexo 4.</b> Fracciones de los extractos orgánicos obtenidos en columna abierta por gravedad usados para la evaluación de la bioactividad.....	63
<b>Anexo 5.</b> Placa resumen en CCF de tubos colectados en la fracción 3. ....	63
<b>Anexo 6.</b> Placa de 96 pocillos usada para la evaluación de actividad Antioxidante de <i>M. rupestris</i> . Ensayo Cualitativo realizado por cuadriplicado. ....	64
<b>Anexo 7.</b> Placa de 96 pocillos usada para la evaluación de la Actividad Antioxidante de <i>M. rupestris</i> . Ensayo Cuantitativo.....	64
<b>Anexo 8.</b> Placa de 24 pocillos usada para evaluación de Actividad Antimicrobiana de extractos de <i>M. rupestris</i> realizado por triplicado.....	65
<b>Anexo 9.</b> Poster "Aplicación de la Cromatografía al Vacío como estrategia de Separación de Extractos Vegetales" presentado en el 1° Congreso Internacional de Química – Ecuador 2018.....	66

## Índice de Ecuaciones

<b>Ecuación 1.</b> Porcentaje de rendimiento de extractos.....	31
<b>Ecuación 2.</b> Porcentaje de inhibición del radical ABTS .....	38
<b>Ecuación 3.</b> Ecuación de la pendiente.....	39
<b>Ecuación 4.</b> Ecuación de la recta .....	39



### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Jimena Guadalupe Cordero Machuca en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Separación bioguiada de extractos orgánicos de *Macleania rupestris* (Joyapa) y evaluación de su potencial nutracéutico” de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 12 de noviembre de 2018

Jimena Guadalupe Cordero Machuca

C.I: 0104673256



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Jimena Guadalupe Cordero Machuca, autora del trabajo de titulación "Separación bioguiada de extractos orgánicos de *Macleania rupestris* (Joyapa) y evaluación de su potencial nutracéutico", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de noviembre de 2018

Jimena Guadalupe Cordero Machuca

C.I: 0104673256



## DEDICATORIA

*A mis padres, Raúl y Lupe por su paciencia y apoyo incondicional en cada uno de los aspectos de mi vida. Por su aliento, para que yo cumpla cada una de las metas que me he propuesto, sin importar lo descabelladas que puedan parecer a veces. Por convertirme en la persona que soy e inspirarme a ser una mejor. Son mi ejemplo y mi fuerza. Gracias por darme alas para poder volar.*

*A mi hermano David, que a pesar de no ser el mayor actúa como tal. Gracias por ser mi hombro de apoyo y mi fuente de desahogo. A mi hermanita Emilia que entre risas, acuerdos y desacuerdos ha sido mi fuerza a lo largo de estos años. Gracias a los dos, por el amor incondicional.*

*A mis amigos, por su amistad y compañía incondicional. Por el apoyo y las mil y una anécdotas y ocurrencias vividas a lo largo de esta aventura llamada universidad. Gracias por ser la familia que me permití elegir.*

*A Dios, por guiarme y protegerme siempre en cada paso que doy.*

**Jimena**



## AGRADECIMIENTOS

*A mis profesores de carrera de la Universidad de Cuenca, por impartirme sus conocimientos a lo largo de todos estos años y por su apoyo para la realización de este trabajo.*

*De manera especial a mi Directora, la Dra. María Elena Cazar, por su paciencia y disposición en todo momento, quien a más de ser mí guía, ha sido mi amiga. Gracias por compartir su valioso conocimiento y experiencia conmigo. Por su confianza y apoyo en las adversidades que se han presentado a lo largo de este camino y por inspirarme a cumplir mis metas académicas, mirando siempre un poco más allá. Ha sido un verdadero privilegio trabajar a su lado.*

*A mis padres y hermanos por ser mi apoyo y creer siempre en mí siempre, aun cuando yo misma lo dejaba de hacer. A toda mi familia por inspirarme a ser mejor cada día.*

*A mis amigos y todos los que de una u otra manera me han ayudado en la realización de este trabajo.*

*Muchas gracias.*

## INTRODUCCIÓN

El número de plantas superiores que hay en el planeta es de aproximadamente 250 000. De estas solamente el 6% han sido sometidas a evaluación de su actividad biológica y un 15% ha sido evaluado fitoquímicamente (Cragg and Newman, 2013). Las plantas son reservorios de compuestos químicos naturales y de moléculas bioactivas estructuralmente diversas. Debido a la vasta variedad de estas moléculas su obtención y estimación cuantitativa y cualitativa es importante para la exploración de nuevas moléculas que podrían ser potencialmente usadas en las distintas Industrias (Ingle et al., 2017).

El historial acerca del uso de las plantas medicinales alrededor del mundo es amplio. En los últimos años ha resurgido el interés en los fármacos provenientes de fuentes naturales, su aplicación y obtención. De acuerdo a los datos publicados por la Organización Mundial de Salud (OMS) casi el 65% de la población del mundo ha incorporado como terapia principal en la atención de la salud, el uso de plantas (Cragg and Newman, 2013). La existencia de múltiples compuestos activos pueden actuar de manera sinérgica en el cuerpo humano y proporcionar a su vez propiedades terapéuticas con efectos secundarios mínimos o no deseados (Khoddami et al., 2013) (Huie, 2002).

En la naturaleza existe un amplio rango de plantas medicinales en los cuales se ha reportado que poseen cantidades elevadas de antioxidantes, como los polifenoles los cuales tienen la capacidad de absorber y neutralizar los radicales libres o de descomponer peróxidos. El consumo regular de estos principios activos se ha relacionado con reducción de las tasas de mortalidad de algunas enfermedades degenerativas (Djeridane et al., 2006). Los efectos generados por el estrés oxidativo en la salud humana constituyen un problema más frecuente, por lo que la investigación de un mayor número de alimentos que posean fitonutrientes ayudarán en la lucha contra estas enfermedades (Krishnaiah et al., 2011). En este contexto, se ha demostrado que las plantas, son una fuente rica de agentes antimicrobianos los cuales pueden encontrarse en flores, frutos o en órganos modificados. Los mismos han sido usados como fármacos potentes en distintos países, sin embargo existe una gran cantidad de especies que no han sido estudiadas aún (Mahesh and Satish, 2008).

*Macleania rupestris* (Kunth) es un arbusto nativo de los bosques Andinos y regiones del páramo que produce frutos comestibles (Veloza et al., 2014). Pertenece a la familia

Ericaceae que es una de las familias más representativas de los bosques Andinos jugando un importante rol ecológico (Durán Casas et al., 2013) pues no está limitado únicamente al cultivo con fines alimenticios sino también en la recuperación de barrancos, bolsas de erosión, laderas, bordes de carreteras, etc. (Veloza et al., 2014).

Se ha determinado que los metabolitos secundarios más representativos de la familia Ericaceae son los flavonoides, metabolitos que poseen con un gran interés científico debido a sus propiedades biológicas, principalmente la de su capacidad antioxidante. Aunque la mayoría de especies de esta familia no poseen reportes de estudios químicos y bioactividad (González Plazas, 2015). De ahí la importancia de realizar la evaluación de la actividad biológica que posee *Macleania rupestris*, resultados que pretenden ayudar a su manejo y comercialización.

El presente trabajo se enfoca a la separación cromatográfica y caracterización de bioactividad de fracciones de *M. rupestris*. Los métodos y resultados obtenidos aportan al conocimiento de la química y bioactividad de esta especie poco estudiada. Para desarrollar esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

Evaluar, mediante estrategias de separación bioguiada, el potencial de *Macleania rupestris* como fuente de sustancias bioactivas con potencial nutracéutico.

### **Objetivos Específicos**

1. Obtener, a partir de extractos orgánicos de *Macleania rupestris*, fracciones bioactivas mediante cromatografía en columnas abiertas.
2. Estandarizar los métodos de separación en columnas abiertas por gravedad y bajo presión.
3. Identificar las fracciones orgánicas responsables de la actividad antimicrobiana *in vitro* hacia las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Estafilococo aureus* ATCC 25923 y antioxidante del extracto de *M. rupestris*.

**Hipótesis:** El fruto de la planta *Macleania rupestris* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios que poseen actividad antioxidante y antimicrobiana, los mismos que podrán ser separados mediante cromatografía de columna abierta.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Familia Ericaceae, características

La familia Ericaceae en el Neotrópico se encuentra representada por aproximadamente 800 especies, la mayoría de estas son endémicas de las regiones montañosas donde varias plantas provenientes de *Vaccinium*, *Macleania* y *Cavendishia* producen frutos comestibles (Veloza, Durán, Magnitskiy, & Lancheros, 2014). La riqueza total de especies incrementa a medida que se acerca a la zona ecuatorial, encontrándose el mayor número de especies en Colombia y Ecuador entre los 1000 – 3000 msnm (Lutelyn, 2002).

Dentro de los bosques Andinos, especialmente en los bosques montañosos y en los páramos, la familia Ericaceae tiene un papel ecológico importante como regulador hídrico y como fuente de alimento (Lagos-Burbano et al., 2010).

### 1.2 *Macleania rupestris*, características

*Macleania rupestris* Kunth es una especie que se encuentra distribuida en Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. Crece en condiciones de suelos ácidos y bien drenados (Calvo Cruz, 2012). Es un arbusto epífito o terrestre que de altura tiene de 0.6 a 2 metros. El fruto es una baya globosa blanco-azulado oscura (Lagos-Burbano et al., 2010) que se doblan hacia arriba y se vuelven de color púrpura-negras cuando ya se encuentran maduras (Fuchs et al., 2010).

Posee hojas coriáceas, planas, elípticas de 3 a 11 mm de largo; flores con 13 -19 mm de largo y un diámetro de 6-9 mm que pueden estar dispuestas hacia atrás. Su color es rojizo o rojizo rosado hacia la base y en la parte distal amarillo pálido o blanco (ilustración 1) (Calvo Cruz, 2012).

La caracterización bromatológica muestra que los frutos maduros poseen un elevado contenido de sólidos solubles y una acidez titulable baja lo que explicaría su valoración para consumirlo como un fruto fresco (Veloza et al., 2014). Además se ha determinado la existencia de contenido mineral como Calcio, Hierro, Potasio, Sodio, Fósforo (Durán Casas et al., 2013).

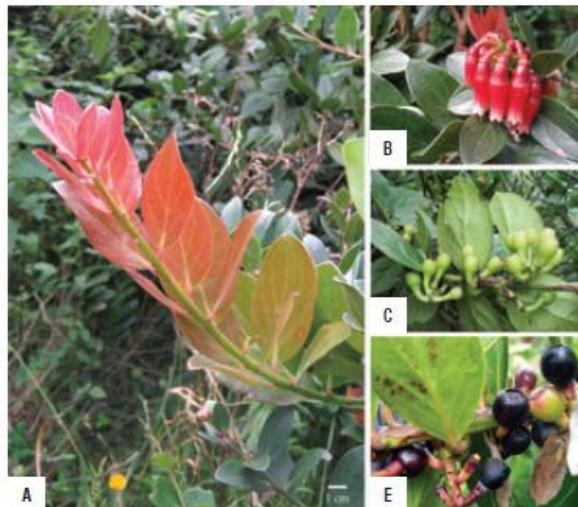


Ilustración 1. Planta de *Macleania rupestris*. A. Hojas. B. Inflorescencia. C. Fruto Inmaduro. E. Fruto Maduro.

Fuente: Durán Casas, Veloza Suan, Magnitsky & Lancheros, 2013

### 1.2.1 Uso de los frutos de *Macleania rupestris*

Los frutos de *M. rupestris* son usados a diferentes niveles:

- Alimenticio: Ampliamente consumidas de forma directa, empleados además para la fabricación de mermeladas, tortas, salsas, néctares, etc. (Corzo Barragán, 2014).
- Medicinal: Usado para disminuir disenterías, diarreas crónicas (González Plazas, 2015) y también como astringente, macerados o comidos directamente. Las hojas son usadas para tratar fiebres tifoideas (Corzo Barragán, 2014).
- Industrial: Obtención de colorantes (Corzo Barragán, 2014).

### 1.3 Extracción

Las plantas poseen un amplio rango de compuestos bioactivos y sus extractos son ampliamente usados en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética (Wang and Weller, 2006). La extracción es uno de los métodos cruciales dentro del análisis de las plantas medicinales, ya que en base a este se realizará la caracterización y separación de las moléculas bioactivas. Ciertas acciones deben ser tomadas para asegurar que los componentes potencialmente activos no sean destruidos, perdidos o distorsionados durante la preparación del extracto de las muestras de plantas (Sasidharan et al., 2010).

La elección del método de extracción y de la técnica analítica más apropiada se realiza con el objetivo de obtener la mejor extracción, purificación o separación del metabolito

secundario deseado. Los extractos de las plantas por lo general son obtenidos usando métodos de extracción sólido-líquido tradicionales como maceración, decocción, percolación, infusión, o por métodos más modernos como extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido, extracción de flujo supercrítico y extracción líquida presurizada (Brusotti et al., 2014) mediante el uso de agua y/u otros solventes orgánicos de plantas frescas o de material vegetal seco y pulverizado. Para poder detectar sustancias que se encuentran en una cantidad muy pequeña, es necesario realizar la concentración del mismo. Este proceso es aconsejable realizarlo a una temperatura baja para evitar la modificación de algún componente termolábil que puede estar presente (Cos et al., 2006).

La selección del solvente a utilizar en la extracción dependerá de la naturaleza de los compuestos a obtener. Para la extracción de compuestos hidrofílicos se usan solventes de carácter polar como metanol o etanol, mientras que para compuestos más lipofílicos como la clorofila pueden ser utilizados solventes como diclorometano o hexano (Sasidharan et al., 2010).

De manera recomendable, siempre que se pueda se debe realizar antes de los ensayos de actividad biológica un fraccionamiento primario del extracto, para separar los componentes polares de los menos polares. Esto nos permite una mejor discriminación entre las fracciones que exhiben una actividad o una citotoxicidad específica (Cos et al., 2006).

### 1.3.1 Métodos de extracción

#### 1.3.1.1 Extracción por método Soxhlet

El método Soxhlet ha sido usado por mucho tiempo para el aislamiento de metabolitos del material vegetal (Romanik et al., 2007). Esta es una técnica bien establecida que supera en rendimiento a otras técnicas de extracción y que ha sido usada como referente en la evaluación del rendimiento del extracto del material vegetal de los otros métodos de extracción sólido-líquido, excluyendo a aquellos en los cuales haya existencia de compuestos termolábiles (Wang and Weller, 2006).

En este método, el material vegetal es colocado dentro de una bolsa porosa, la misma que será puesta dentro de la cámara del aparato de Soxhlet (A) (ilustración 2). El solvente a usar se coloca dentro del matraz (B) y se calienta hasta la evaporación

(Handa et al., 2008). Los vapores van a ser condensados en el sistema de enfriamiento (C) y regresarán a la cámara A. Cuando el líquido recolectado llega a un nivel adecuado, el sifón aspira la solución y lo lleva de regreso hacia el matraz arrastrando los solutos extraídos. En el matraz, el soluto es separado del solvente mediante el uso de destilación (Wang and Weller, 2006). Este proceso es continuo y es llevado acabo hasta que una gota de solvente del sifón no deje ningún residuo cuando se evapore (Handa et al., 2008).

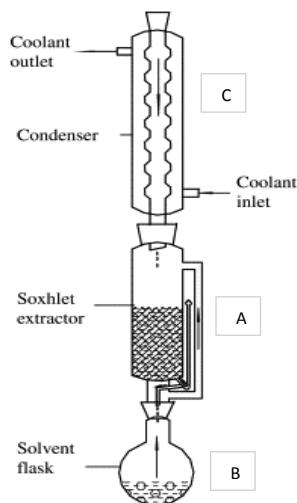


Ilustración 2. Aparato de extracción Soxhlet. Fuente: Wang & Weller, 2006

### 1.3.1.2 Extracción por Maceración

Es un proceso de extracción sólido - líquido que consiste en poner el material vegetal que se va a extraer en contacto con el solvente durante varios días. Este proceso da como resultado un equilibrio de concentración entre el solvente y el material vegetal. El rendimiento del método depende de factores relacionados con el material vegetal y con el solvente. Entre los relacionados con la material vegetal se encuentra el tamaño de la partícula, el contenido de humedad, naturaleza y cantidad; mientras que los relacionados con el solvente está la selectividad y la cantidad de solvente usado (Nikolai, 2000).

Si es que al proceso de maceración se le añade agitación y se usa material triturado puede conducir a una mejor extracción. La agitación ocasional ayuda a la difusión del solvente y también asegura la dispersión de la solución concentrada que se acumula alrededor de la superficie de las partículas (Handa et al., 2008). El sistema puede quedarse durante 7 días. Al final de la maceración cuando el equilibrio se ha alcanzado,

el sistema es filtrado con el uso de papel filtro o de cualquier otro método adecuado (Handa et al., 2008).

#### 1.4 Separación de compuestos bioactivos

Los extractos de las plantas generalmente poseen una combinación de varios tipos de compuestos (Sasidharan et al., 2010) pero solamente unos pocos son los responsables de los efectos tóxicos o farmacológicos que se le atribuyen a una planta determinada (Huang et al., 2004). Compuestos que van a estar dentro de un gran rango de polaridades e hidrofobicidad. Entre los grupos más importantes se encuentran los de polaridad baja (terpenoides, ceras), semi-polares (lípidos, compuestos fenólicos, alcaloides de baja polaridad) y los de polaridad elevada (glucósidos polares, alcaloides polares, péptidos, proteínas) (Romanik et al., 2007). Según el tipo de solventes que se usen de acuerdo a su polaridad, diferentes tipos de extractos podrán ser obtenidos y si se aplican los métodos de purificación adecuados estos extractos podrán ser divididos a su vez en distintas fracciones (ilustración 3) (Nyiredy, 2004).

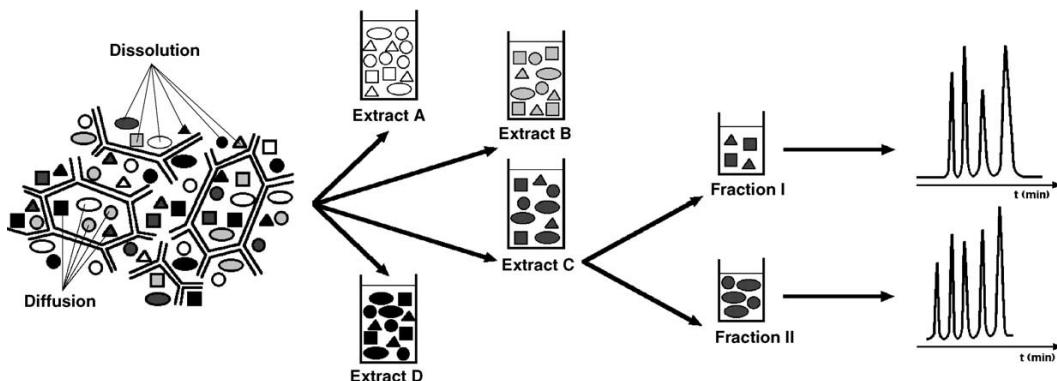


Ilustración 3. Diagrama de extracción y separación de los componentes que forman parte de un extracto total hasta la obtención de una fracción y su identificación fitoquímica. Fuente: Nyiredy, 2004.

Ya que las plantas poseen varios tipos de compuestos, su separación sigue siendo un gran reto para el proceso de identificación y caracterización (Ingle et al., 2017). Generalmente, durante los trabajos de investigación se utilizan métodos como Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía de Columna, Cromatografía flash, Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex) y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) con el objetivo de facilitar su identificación y/o aislamiento (Sasidharan et al., 2010).

Cuando la existencia de datos sobre la composición química de un extracto crudo es escasa, una purificación o preparación preliminar deber ser llevada a cabo basada en las propiedades ácido - básicas y lipofílicas - hidrofílicas (Brusotti et al., 2014).

La preparación previa de la muestra a estudiar tiene por lo menos tres pasos:

- 1) Preparación preliminar de la muestra: El material vegetal es secado o liofilizado, seguido de la reducción del tamaño de la partícula y de la homogenización.
- 2) Extracción de componentes solubles con solventes adecuados.
- 3) Enriquecimiento del analito y eliminación de interferencias (Romanik et al., 2007).

Los compuestos obtenidos, posteriormente serán usados para la investigación de su estructura y actividad biológica. Además de que se pueden usar métodos no cromatográficos para la identificación de compuestos bioactivos como Inmunoensayos con anticuerpos monoclonales, espectroscopia infrarroja, etc. (Sasidharan et al., 2010).

#### **1.4.1 Cromatografía**

La cromatografía es un método de separación e identificación de componentes presentes en mezclas complejas (Gallego Picó, 2012), donde la separación se da a través de un sistema formado por una fase estacionaria fijada a una columna o superficie sólida y desplazada gracias a una fase móvil que puede ser gaseosa, líquida o un fluido supercrítico (Alfonso Méndez, 2009). En esta técnica las moléculas son separadas en base a su tamaño, forma o carga (Ingle et al., 2017). En el caso de la cromatografía líquida, la fase móvil usada puede ser desde un solvente puro hasta una mezcla de componentes múltiples (Nyiredy, 2004).

Según la finalidad para el uso de la cromatografía esta puede ser, preparativa, si es que el objetivo es la separación y purificación de los componentes de una mezcla, o analítica si es que se utiliza para evaluar presencia y concentración de un analito (Dominguez Ordoñez, 2017).

##### **1.4.1.1 Cromatografía en Capa Fina**

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica simple, rápida y económica que permite responder la intriga al investigador de cuantos compuestos existen en una mezcla. Además se puede utilizar como prueba para identificar a un compuesto en una mezcla, cuando se realizan comparaciones entre los  $R_f$  (distancia de migración del analito/ distancia de la migración de la fase móvil) del compuesto a determinar y de uno conocido (Sasidharan et al., 2010).

La CCF es una cromatografía de adsorción donde las muestras son separadas según la interacción entre las capas de adsorbente (tabla 1) adheridas en la placa (Ingle et al., 2017). La capilaridad es la principal fuerza que influencia la migración de la fase móvil a través de la fase estacionaria (Nyiredy, 2004). La velocidad en la que un soluto se moverá a través de la fase estacionaria dependerá de la fase móvil ya que disolverá el soluto y lo hará ascender en la placa (Santiago and Strobel, 2013).

La CCF es usada como una herramienta para identificar la identidad de un compuesto y su pureza. De manera más común es una técnica usada para evaluar el proceso de una reacción química o para analizar las fracciones recolectadas en una separación cromatográfica más grande (Meyers and Meyers, 2008).

Diferentes adsorbentes pueden ser usados para separar varios componentes (Tabla1).

<b>Adsorbente</b>	<b>Usado Para Separar:</b>
Sílica gel	Aminoácidos, Alcaloides, Azúcares, Ácidos Grasos, Lípidos, Etc.
Aluminio	Alcaloides, Fenoles, Esteroides, Vitaminas Y Carotenos
Celita	Esteroides Y Cationes Inorgánicos.
Polvo De Celulosa	Aminoácidos, Pigmentos Alimenticios, Alcaloides
Almidón	Aminoácidos
Sephadex	Aminoácidos, Proteínas

Tabla 1. Diferentes tipos de adsorbentes usados para separar varios compuestos. Fuente: Ingle et al., 2017.

La separación que los compuestos químicos han tenido en la placa de la CCF se cuantifica en términos del **valor de  $R_f$**  (Cheng et al., 2011). Aunque el valor de  $R_f$  de un punto en particular es capaz de brindar un poco de información sobre la identidad de un compuesto, no siempre se puede reproducir de manera exacta, la cantidad de muestra colocada en la placa, por ejemplo, puede llegar a ser un factor de variación, razón por el cual el valor de  $R_f$  no puede ser usado solo. El uso de un compuesto estándar puede ayudar a determinar la identidad. La visualización de estos compuestos en la placa de

CCF puede ser observada de manera directa siempre y cuando estos sean coloreados. Para los compuestos que no son coloreados existen métodos alternativos a los que se los clasifica dentro de tres grupos: destructivos, no destructivos y semi destructivos (Meyers and Meyers, 2008).

#### **1.4.1.2 Cromatografía en columna abierta por gravedad**

Cromatografía en columna abierta es una técnica preparativa, en donde la fase estacionaria es suspendida en la fase móvil previamente ya seleccionada y posteriormente empacada en una columna de vidrio (ilustración 4) (Busia, 2016). Una de las ventajas que la cromatografía en columna tiene, es que se puede llevar a cabo sin el uso de equipos especiales y permite la obtención de buenos resultados sin la necesidad de contar con un nivel de experiencia elevado para su ejecución (Cranwell et al., 2017). Además tiene aplicaciones analíticas y preparativas que permitirán determinar la cantidad de componentes dentro de una mezcla (Busia, 2016).

Dependiendo del tipo de compuesto y de la cantidad que se vaya a correr en la cromatografía, la dimensión de la columna y la cantidad del absorbente a usar variará (Beckett & Stenlake, 1988), la fase móvil puede ser única o una mezcla de disolventes con incrementos de polaridad. Las velocidades con las que los componentes se separan dependerán de la interacción que la mezcla de componentes tenga con la fase móvil y estacionaria. Conforme el solvente recorre la columna de vidrio, se recolectan las distintas fases (Busia, 2016), no existe una guía general en la que se indique la cantidad de fracciones que se deben obtener, pero las mezclas complejas requieren un mayor número de fracciones. Para obtener la máxima separación se recomienda un flujo de alrededor una gota cada dos segundos o mucho más lento si es que la separación es complicada (Cranwell et al., 2017).

Para poder obtener buenos resultados en la cromatografía se debe probar el sistema de eluyentes, para lo que de manera general se usa la cromatografía de capa fina. Cuando el sistema de eluyentes se encuentra compuesto por disolventes de varias polaridades la manera común de hacerlo es mediante el uso del solvente menos polar primero, lo que permitirá que los componentes se adsorban a la fase estacionaria, para posteriormente realizar un cambio gradual de la polaridad con la finalidad de desorber los componentes y que corran junto con la fase móvil (Busia, 2016).

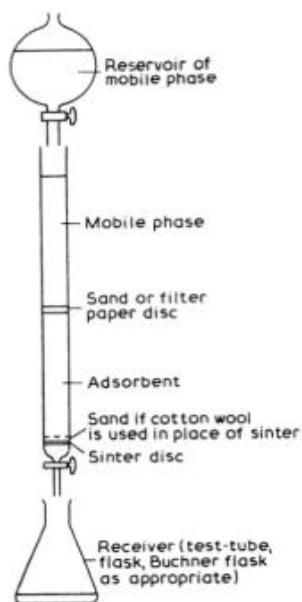


Ilustración 4. Equipo para Cromatografía en Columna por gravedad. Fuente Beckett & Stenlake, 1998

#### 1.4.1.3 Cromatografía en columna bajo presión

Un método clásico de separación es la cromatografía en columna bajo presión o al vacío que permite separar una mezcla de manera rutinaria y con una mejor resolución que la Cromatografía en capa fina (CCF). Este método es muy adaptable y ha sido usado para separar más de 150 g de un compuesto por columna (Tortzen, 2008).

El procedimiento se asemeja mucho a otros tipos de cromatografía, en el que la columna se empaqueta, se carga la muestra y se eluye. La columna consiste en un lecho seco de sílica gel colocado en una columna de vidrio y eluido con la ayuda de una bomba de vacío, obteniéndose distintas fracciones que son comparables a las obtenidas con CCF analítico (ilustración 5) (Shusterman et al., 1997). Los compuestos a analizarse eluirán de una mejor manera al usar un sistema de solventes en el que los valores de  $R_f$  en la CCF analítica sean de aproximadamente de 0.5 (Pedersen and Rosenbohm, 2001).

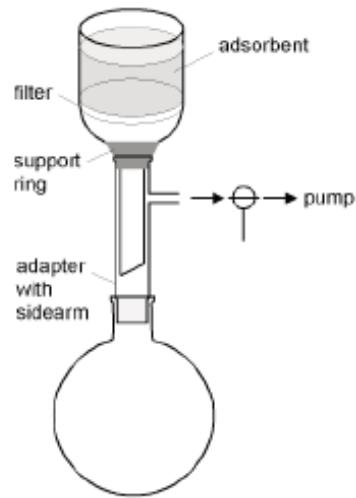


Ilustración 5. Equipo para realizar cromatografía al vacío. Fuente: Pedersen Sejer & Rosenbohm, 2001

La cromatografía en columna es un método rápido y económico de separación preparativa para mezclas que requieren una resolución moderada. En caso de que una resolución más elevada sea necesaria, una purificación preliminar por esta técnica permitirá una separación simplificada sin correr el riesgo de contaminar las columnas del HPLC (Still et al., 1978). Además de que la calidad de los resultados obtenidos en la Cromatografía de gases o el HPLC depende ampliamente de un pre-fraccionamiento realizado en los extractos crudos del material vegetal, campo en el que la Cromatografía en columna es comúnmente aplicada (Wijesekera, 1991).

### Consideraciones para realizar la cromatografía

- *Tamaño de la partícula del sílica gel:* La resolución será determinada por el tamaño de la partícula. Tamaños pequeños brindan una buena resolución, pero si es que son muy pequeños la compactación de la columna será muy grande y la elución por lo tanto será de una manera muy lenta (Pedersen and Rosenbohm, 2001).
- *Altura de la columna:* Las columnas típicamente usadas se encuentran con alturas entre los 4 – 7 cm. Una columna más larga no producirá una mejor separación (Tortzen, 2008).
- *Sistema de eluyentes:* El sistema de eluyentes será elegido según los resultados obtenidos en la separación realizada en la CCF. Valores de Rf de aproximadamente 0.5 permitirán que la separación en la columna se realice de manera correcta (Tortzen, 2008).
- *Volumen de cada fracción:* Cuando la bomba de vacío se encuentra encendida debe quedar al menos 2 cm de solvente sobre la sílica, cuando las primeras

gotas salen de la columna. El volumen total que se usará en cada fracción no posee límite alguno (Tortzen, 2008).

### **1.5 Alimentos Funcionales**

Son conocidos como alimentos funcionales aquellos que de forma natural o procesada, además de contener componentes nutritivos poseen componentes que despeñan una actividad biológica específica que favorece a la salud de una persona (Alvídrez-Morales et al., 2002). Se empezó a hablar de estos alimentos en la década de los 80 en Japón, lugar en el que las autoridades vieron la importancia de proporcionar una mejor calidad de vida a la población con la expectativa de controlar los gastos de salud pública y de aumentar la expectativa de vida de la población (Valenzuela B et al., 2014).

Dentro de los alimentos funcionales se encuentran aquellos que son ricos en minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibras alimenticias, alimentos que han sido añadidos sustancias biológicamente activas y probióticos (Luengo Fernández, 2007). En el mercado mundial actualmente existe una gran variedad de alimentos funcionales con distintos componentes nutracéuticos diseñados específicamente para tratar problemas de salud de poblaciones puntuales (Alvídrez-Morales et al., 2002).

Se debe señalar que los alimentos funcionales no son indispensables dentro de la dieta y que por sí solos estos no curan, ni previenen enfermedades. Al estar dentro del marco de “alimento” debe mostrar sus efectos en cantidades normales dentro de la dieta (Luengo Fernández, 2007). Actualmente los alimentos no son evaluados solamente en términos de macro y micronutrientes, sino componentes activos y su papel en la prevención y tratamiento de enfermedades también son evaluados (Guzmán A et al., 2009).

### **1.6. Actividad Antioxidante**

Los seres vivos al utilizar oxígeno para la generación de energía producen radicales libres, los mismos que en caso de que no existieran mecanismos de defensa pueden llegar a producir incompatibilidad con la vida. Estos mecanismos son realizados por los antioxidantes, los cuales son considerados como tales cuando la afinidad que poseen para interaccionar con un radical libre es superior al de cualquier otra molécula (García

Bacallao et al., 2001). Los radicales libres son especies que se encuentran dotadas de un electrón desapareado, lo que les confiere una reactividad elevada (Mosquera M et al., 2005), dando lugar a la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), estando entre los principales: peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ) y radical hidroxilo ( $OH^-$ ) (Viada Pupo et al., 2017), los mismos que pueden provenir de una fuente endógena como alteraciones a nivel de la respiración celular o exógeno como la exposición a rayos UV, rayos X, contaminantes atmosféricos, compuestos orgánicos en combustión, etc. Si es que estas especies no son neutralizadas de manera adecuada pueden llegar a causar daño en las macromoléculas como lípidos, glúcidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando alteraciones celulares y desencadenando en patologías (Palomo G et al., 2009).

La búsqueda de antioxidantes provenientes de fuentes naturales en los últimos años ha ido recibiendo una atención elevada y estos esfuerzos han permitido identificar varias fuentes naturales de los mismos. Permitiendo con esto además formular alimentos nutracéuticos que podrían ayudar a la prevención del daño oxidativo que ocurre en el cuerpo (Dudonné et al., 2009).

### **1.6.1 Compuestos antioxidantes en plantas medicinales**

Las plantas medicinales desde tiempos muy antiguos han sido usadas con el objetivo de disminuir los síntomas de una enfermedad. Un número muy grande de plantas han sido estudiadas por sus propiedades antioxidantes. Los metabolitos que tienen actividad antioxidante son efectivos para la prevención de procesos destructivos causados por el estrés oxidativo ya sea que estos se encuentren en los extractos como tal o el constituyente químico aislado (Saeed et al., 2012). Existen compuestos con actividad antioxidante obtenidos de manera sintética como el butilhidroxianisol (BHA) o butil hidrotolueno (BHT) que han atribuido a la elevación del colesterol, hepatomegalia entre otros, como efectos secundarios. A partir de esto se ha derivado la importancia de encontrar moléculas alternas provenientes de fuentes naturales (Rojano et al., 2008). Las frutas, vegetales o infusiones se han reportado como alimentos que poseen grandes cantidades de antioxidantes naturales, además de la amplia relación mostrada entre la prevención de enfermedades cardiovasculares y del cáncer con el aumento de su consumo (Kratchanova et al., 2010). Muchas otras especies han sido objeto de estudio

en busca de nuevos antioxidantes, pero existe todavía falta de información acerca de su potencial y de su seguridad (Patel et al., 2010).

### 1.6.2 Métodos de determinación de actividad antioxidante

Algunos métodos que se utilizan para evaluar la actividad antioxidante, se basan en la medición de la capacidad de captura de radicales libres por parte de los antioxidantes, asumiendo que la oxidación es inhibida cuando un elevado porcentaje de ellos es capturado. Este principio que es aplicado en los métodos como el de ABTS (ácido 2,2 ázinobis-(3-etylbenziazolina)-6-sulfónico) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (Mosquera M et al., 2005).

De manera general existen dos tipos de ensayos, el uno que se basa en la transferencia de electrones que involucra un oxidante coloreado como los ensayos de ABTS, DPPH, y FRAP (Capacidad Reductora Férrea del Plasma). El otro involucra la transferencia de átomos de hidrógeno como el ensayo ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno) en los que los antioxidantes y el sustrato compiten por radicales de peróxido generados térmicamente. Específicamente el método de ABTS se basa en la generación de un catión ABTS<sup>+</sup> azul verdoso que puede ser reducido por los antioxidantes; el ensayo de DPPH se basa en la reducción del DPPH· Purpura a 1,1-difenil-2-picryl hidracina. Estos dos ensayos son convenientes para su aplicación y son los más populares, sin embargo se encuentran limitados ya que no utilizan radicales fisiológicos. Por otro lado el ensayo de ORAC detecta el cambio químico en una molécula fluorescente causada por el ataque de radicales libres (Floegel et al., 2011).

Estos dos métodos ABTS Y DPPH, tienen una gran estabilidad ante ciertas condiciones, pero entre ellos existen diferencias. El DPPH puede ser obtenido sin una preparación previa, a diferencia del ABTS que debe ser producido después de una reacción química, enzimática o electroquímica. El radical ABTS permite medir la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica y su absorbancia máxima se encuentra entre los 414, 654, 754 y 815 nm. Mientras que el DPPH puede disolverse solo en medio orgánico y su pico de absorbancia máximo está a 515 nm (Kuskoski et al., 2005).

#### 1.6.2.1 Método ABTS

El método del barrido del radical ABTS fue desarrollado por Rice Evans y Miller in 1994. Junto con el método de DPPH es uno de los métodos más ampliamente utilizados para la determinación de actividad antioxidante realizado en ensayos con muestras de plantas (Krishnaiah et al., 2011).

Este ensayo de decoloración mide la capacidad antioxidante total de las sustancias lipofílicas e hidrofílicas. El efecto de la concentración del antioxidante y de la duración de la inhibición del radical se determinan luego de que la actividad antioxidante sea valorada (Krishnaiah et al., 2011). El método es sencillo y rápido, adicionando que presenta diversas ventajas como la ausencia de reacciones adversas no deseadas, el no necesitar de temperaturas elevadas para la generación de los radicales ABTS y la flexibilidad de permitir realizar la medición de la actividad antioxidante en un amplio rango de pH. El radical ABTS es considerado como un cromógeno por excelencia para la medición de propiedades antioxidantes de productos puros o de mezclas complejas (Cano et al., 2002).

En este ensayo se produce un cromóforo mediante la reacción de oxidación del compuesto ABTS con persulfato de potasio (Gaviria Montoya et al., 2009) produciendo compuestos con coloraciones azules verdosas con longitudes de onda máximas de 415, 645, 734 y 815 nm (Restrepo Sánchez et al., 2009). Cuando existen compuestos con actividad antioxidante ocurre una disminución de la absorbancia del radical ABTS que es proporcional a su actividad antioxidante o concentración (Pan et al., 2010). De manera preferencial se aplica en la evaluación de la actividad antioxidante en muestras coloreadas, esto al presentar una absorción máxima que se encuentra próxima a la región infrarroja (734nm) disminuyendo con esto las probabilidades de tener una interferencia con otros compuestos que se absorben en la región visible o de compuestos que provienen de reacciones secundarias (Kuskoski et al., 2005).

### 1.6.3 Actividad Antimicrobiana

Desde tiempos pasados el hombre utiliza las plantas para preservar alimentos y combatir las enfermedades. Las plantas y demás fuentes naturales pueden brindar un gran rango de compuestos complejos. En los últimos años, algunos investigadores se han centrado en la investigación de plantas y extractos antimicrobianos, aceites esenciales, metabolitos secundarios puros y nuevas moléculas sintetizadas como agentes antimicrobianos potentes (Balouiri et al., 2016), para lo que se han realizado

cribados iniciales de las plantas que posiblemente tengan una actividad antibacteriana, mismos que de manera general inician con el uso de extractos crudos metanólicos o etanólicos (Parekh et al., 2006).

Los crecientes problemas de resistencias bacterianas por el uso indiscriminado de antibióticos y el aumento en la necesidad de la Industria Alimentaria para contar con alternativas en la conservación de los productos (Sauceda, 2011) ha ocasionado que los científicos vean la necesidad de buscar nuevas alternativas para hacer frente a esta problemática, con el objetivo de contar con nuevos agentes antimicrobianos con mecanismos de acción alternos y la menor cantidad de efectos tóxicos, en los últimos años se ha visto el crecimiento de la industria farmacéutica natural (Díaz Solares et al., 2017).

### **1.6.3.1 Métodos de determinación de actividad antimicrobiana**

#### **1.6.3.1.1 Método de dilución de placas**

El método de dilución en placa es de los métodos más apropiados para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) ya que permite estimar la concentración del agente antimicrobiano en estudio capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. Este método puede ser realizado en agar (dilución de agar) o en caldos de cultivo (macro dilución o micro dilución). Estos dos métodos han sido usados para determinar de manera cuantitativa la actividad antimicrobiana contra bacterias u hongos. Generalmente es expresando en  $\mu\text{g/ml}$  o  $\text{mg/l}$  (Balouiri et al., 2016).

El método de dilución se realiza mediante la adición de concentraciones crecientes de las bacterias a analizar en medios líquidos o sólidos, las cuales poseen un número de células bacterianas definido. La presencia de turbidez o de una sedimentación en el caldo o la presencia de microrganismos en las cajas Petri posterior a la incubación indica el crecimiento de los microorganismos (Reyes Jurado et al., 2014). Se puede recurrir además a la utilización del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células metabólicamente activas pueden reducir el MTT haciendo que pase de una solución de color amarillo a formazán, compuesto insoluble en forma de cristales violeta que precipita y es insoluble en agua. Se absorbe en una longitud de onda que va desde los 550 a los 570 nm (Ramirez and Castaño, 2009).

Dentro de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos se debe tener en cuenta algunas características como son:

- Evaluación de mínimo dos microorganismos, un Gran positivo y un Gran negativo. Además las cepas a utilizar deben ser ATCC caracterizadas de manera adecuada, sin embargo las cepas obtenidas de aislamientos clínicos también pueden ser utilizadas
- El inoculo recomendado se encuentra en el rango de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml
- La concentración de los extractos a ser evaluados de manera recomendable no deben ser superiores 1 mg/ml y 0.1 mg/ml para los compuestos aislados (Ramirez and Castaño, 2009).

## II. METODOLOGÍA

### 2.1 Preparación del material vegetal

El material vegetal utilizado para el trabajo de investigación fueron los frutos maduros de *Macleania rupestris* (Joyapa) que fueron adquiridos en los mercados locales del cantón Cañar perteneciente a la provincia del Cañar, Ecuador. Los frutos, previamente a su utilización fueron liofilizados y triturados (Anexo 1) por medios mecánicos, usándose para este caso un procesador de alimentos.

### 2.2 Obtención de extractos

El proceso de extracción se realizó a partir del material vegetal previamente triturado y homogenizado. El solvente escogido para la extracción fue metanol (Sigma-Aldrich®, EE.UU) de 99.8% de pureza. Los métodos aplicados fueron Soxhlet y Maceración. Cada extracto obtenido fue concentrado por destilación *in vacuo* en un Rotavapor (Heidolph® Laborota 4000, Alemania) a 43°C, obteniéndose el rendimiento de extracción, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left( \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso de material vegetal inicial}} \right) * 100$$

Ecuación 1

#### 2.2.1 Método de Soxhlet

Para la extracción con el método Soxhlet se pesaron 46.92 g de material vegetal empaquetado dentro de un papel filtro. La muestra se introdujo dentro del cartucho del equipo de Soxhlet y se colocó el solvente necesario para que se dé el sifonamiento (300 ml aproximadamente) (ilustración 6). Se encendió el manto calefactor (Fisher Scientific®, EE.UU) a la temperatura de ebullición del solvente. Al completar los ciclos de extracción (8 ciclos aproximados) se tomó el extracto y se concentró por destilación *in vacuo* en un Rotavapor (ilustración 8).



Ilustración 6. Equipo de Soxhlet usado durante para la obtención del extracto metanólico de *M. rupestris*. Fuente: Autora

### 2.2.2 Maceración

En la obtención del extracto por el método de maceración, se pesaron 100 g del material vegetal liofilizado y pulverizado. El material vegetal se colocó en contacto con cantidad suficiente para su total cobertura (300 ml aproximadamente), dejándose en reposo y en la oscuridad a temperatura ambiente por 6 días (ilustración 7). Posteriormente, se filtró el producto y el material vegetal se volvió a colocar en el recipiente con 300 ml de metanol fresco y se repitió el proceso dejándolo en reposo por 8 días. Los extractos obtenidos se unieron y fueron llevados a concentración por destilación *in vacuo* usando un Rotavapor (ilustración 8).



Ilustración 7. Recipiente usado durante el proceso de maceración. Fuente: Autora



Ilustración 8. Rotavapor utilizado durante el proceso de concentración de los extractos Fuente: Autora

## 2.3 Fraccionamiento del extracto

Con la finalidad de separar los compuestos que se encuentran en los extractos obtenidos de *M. rupestris* se realizó un fraccionamiento, usando variaciones de polaridad. Para el efecto se usó cromatografía en columna en cada uno de los extractos totales extraídos por los métodos de Soxhlet y maceración, siguiendo la técnica desarrollada por L. H. Harwood a inicios de 1980 y descrita por Tortzen (2008). Además, se separaron los compuestos del extracto de maceración de *M. rupestris* por cromatografía abierta, para comparar la eficiencia de esta metodología con la cromatografía en columna al vacío.

### 2.3.1 Fraccionamiento en columna bajo presión

#### I. Empaquetamiento de la columna

Fueron empacadas dos columnas cromatográficas bajo presión,. Una para cada extracto (obtenido por el método de Soxhlet y maceración). Como columna se usó un embudo Büchner de vidrio de 70 mm de diámetro y longitud de 80 mm. Se empaquetó el mismo con 120 g de sílica gel de tamaño de poro de 60 °A (Sigma-Aldrich®, EE.UU), la cual fue suspendida en 400 ml de cloroformo (Merck®, Alemania). La suspensión solvente-sílica se colocó dentro de la columna previamente ensamblada, evitando la formación de desniveles (ilustración 9). Posteriormente se encendió la bomba de vacío

con el objetivo de que el solvente descienda hasta que llegar a dos centímetros aproximadamente por encima del nivel de la sílica. Mientras este proceso ocurría se verificó que el descenso del solvente se realice de una manera recta y horizontal, garantizando un empaquetamiento adecuado. Finalmente se colocó un pedazo de papel filtro en la parte superior para nivelar la columna.

## II. Sembrado de la muestra

El extracto fue colocado en la parte superior de la columna con el objetivo de formar una cabeza de siembra. Para esto se disolvió el extracto con la menor cantidad de solvente (metanol) posible, posteriormente se procediendo a extenderla homogéneamente a lo largo del diámetro de la columna. En la columna se colocaron 23.07 g y 35.20 g de muestra para el fraccionamiento del extracto por el método de Soxhlet y maceración respectivamente (ilustración 10)



Ilustración 9. Equipo de Cromatografía en Columna Bajo presión durante el proceso de empaquetado. Fuente: Autora



Ilustración 10. Columna para fraccionamiento bajo presión con extracto sembrado (cabeza). Fuente: Autora

## III. Elución de fracciones

El sistema de solventes usado para la elución fue cloroformo / metanol, pues este sistema después de ser probado en CCF fue el que evidenció realizaría una mejor

separación de los componentes del extracto. Para iniciar con el fraccionamiento de cada uno de los extractos se empezó la dilución con 100% de cloroformo hasta llegar al 100% de metanol, realizando incrementos en su proporción del 20% (Tabla 2). Esto con la finalidad de crear un gradiente de polaridad creciente (Anexo 3).

Fracción	Cloroformo	Metanol	Volumen
	(%)	(%)	(ml)
1	100	0	200
2	80	20	200
3	60	40	200
4	40	60	200
5	20	80	200
6	0	100	200

Tabla 2. Proporciones del sistema de solventes usadas para cada uno de las fracciones obtenidas.

Las fracciones ya recolectadas se concentraron *in vacuo* mediante el uso del rotavapor. Al final se realizó una placa resumen en CCF con todas las fracciones para poder evidenciar la separación de los grupos de metabolitos presentes en el extracto. La CCF se realizó en una placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck®, Alemania), siendo la fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol en proporción 1:1.

### 2.3.2 Fraccionamiento en columna abierta por gravedad

#### I. Empaquetamiento de la columna

Para realizar el fraccionamiento por esta técnica se utilizó una columna de vidrio de boro silicato de 300 mm de largo y 40 mm de diámetro. La fase estacionaria fue sílica gel de tamaño de poro de 60 °A (Sigma-Aldrich®, EE.UU), de la cual se pesaron 100 g. El 80 % de la fase estacionaria se destinó para empaquetar la columna y el 20% restante para formar la cabeza sólida impregnada con el extracto.

La sílica gel fue suspendida en 200 ml de cloroformo y vertida posteriormente dentro de la columna de vidrio. Se abrió la llave inferior, permitiendo que el solvente recorra la columna y descienda hasta quedar aproximadamente dos centímetros por arriba de la sílica. Con la finalidad de eliminar las burbujas presentes y asegurar la compactación de la columna, se dieron pequeños golpes usando una varilla de vidrio. Posterior a esto se colocó una capa de algodón para nivelar la columna y aislarla de la cabeza. Es importante señalar que el solvente nunca debe descender por debajo del adsorbente

pues pueden darse agrietamientos y burbujas de aire a lo largo de la columna lo que daría paso a una disminución en la calidad de la resolución de la columna (Beckett and Stenlake, 1988).

## II. Elaboración de la cabeza

La aplicación de la muestra en la columna abierta por gravedad se realizó mediante la elaboración de una cabeza sólida. El extracto a usar fue el obtenido por el método de maceración, para lo que se procedió a tomar 4.07 g del mismo y a disolverlo en el menor volumen de metanol y a mezclarlo con el adsorbente (sílica gel). Con la ayuda del rotavapor se eliminó el solvente obteniéndose una mezcla homogénea de extracto y sílica. Mezcla que se colocó en la columna (ilustración 11).



Ilustración 11. Columna abierta usada para el fraccionamiento bajo gravedad. Fuente: Autora

## III. Elución de fracciones

El sistema de solventes usado para la elución al igual que en las columnas bajo presión fue cloroformo / metanol. Inicialmente la elución de la columna se planteó realizarla de la misma manera que las columnas bajo presión, para al final de la misma obtener nuevamente 6 fracciones. Pero debido a la aparición de bandas durante el fraccionamiento (Anexo 2), las mismas que fueron recogidas en tubos y evaluadas de manera permitente en CCF para evidenciar la homogeneidad en sus patrones, se obtuvo al final un total de 10 fracciones (Tabla 3).

Fracción	Proporción		Volumen usado (ml)
	Cloroformo (%)	Metanol (%)	
1	100	0	100
2	80	20	160
3			
4			
5	70	30	220
6			
7	60	40	100
8	40	60	100
9	20	80	100
10	0	100	100

Tabla 3. Proporciones del sistema de solventes usado para cada una de las fracciones obtenidas al final del fraccionamiento.

De la misma manera que en la cromatografía en columna bajo presión, las fracciones ya recolectadas se concentraron *in vacuo* y se analizaron mediante el uso de CCF.

## 2.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el método ABTS

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó en los dos extractos (Soxhlet y maceración) y en cada una de las seis fracciones obtenidas en la cromatografía de columna bajo presión (Anexo 4). Las fracciones obtenidas mediante el uso de la cromatografía en columna bajo presión fueron escogidas debido a que nos permiten comparar los resultados que se vayan obteniendo en los ensayos de actividad biológica. Esto se realizó mediante el uso del ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS<sup>+</sup>, el cual cuantifica la decoloración del radical por la interacción existente con especies donantes de electrones.

### 2.4.1 Determinación cualitativa de actividad antioxidante

El análisis cualitativo se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el *Manual GIBEX Screens to nature* (2014). Los extractos y las fracciones fueron llevados a una concentración de 100 mg/ml. Para el control negativo se usó metanol y para el control positivo se usó una solución de catequina 10 mili Molar. El ensayo fue realizado en una

placa de 96 pocillos donde se colocó 100  $\mu\text{L}$  de la solución del radical junto con 50  $\mu\text{L}$  de las soluciones de cada uno de los extractos y de sus fracciones correspondientes. Se dejó que ocurra la reacción y pasados 5 minutos se leyeron los resultados comparándolos con los controles positivos y negativos. El ensayo fue realizado por cuadruplicado.

#### 2.4.2 Determinación cuantitativa de actividad antioxidante

Siguiendo con la evaluación de la actividad antioxidante, se determinó el porcentaje de inhibición de la absorción del radical ABTS o conocido también como el porcentaje de atrapamiento del radical ABTS en las muestras que presentaron una elevada positividad en el análisis cualitativo. Para el efecto se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de los extractos y sus fracciones positivas obtenidos por los dos métodos de extracción. Se realizaron diluciones seriadas, obteniéndose concentraciones para el ensayo de 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml y 3.125 mg/ml. En estas soluciones se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución del radical ABTS, se dejó reaccionar por 5 minutos y se hizo la lectura de la absorbancia en el lector de micro placas (BioTek® Epoch, EE.UU) a una longitud de onda de 734 nm. La fórmula usada para la determinación del porcentaje de inhibición fue la siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{A0 - As}{A0} \right) 100$$

Ecuación 2

Donde:

A0: Absorbancia del control

As: Absorbancia del extracto

Además se determinó la Concentración Inhibitoria 50 (IC50). El cálculo se realizó a partir de los resultados del porcentaje de Inhibición de las fracciones, diluidas en el rango de concentración 100 mg/dl – 3.25 mg/dl. Se consideraron inactivas a las fracciones que no alcanzaron el 50% de inhibición a la concentración mayor. La IC50 se representa como la habilidad de las fracciones de atrapar el 50% de radicales ABTS, para lo que se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{y2 - y1}{m2 - m1}$$

Ecuación 3

$$y = mx + b$$

Ecuación 4

## 2.5 Análisis Estadístico

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en la Concentración Inhibitoria 50 (IC 50) de los dos grupos evaluados (extractos por Soxhlet y maceración con sus respectivas fracciones bioactivas), los datos con un  $n = 9$  (para cada uno de los parámetros) se sometieron a la prueba estadística T de student para muestras independientes, utilizando un nivel de confianza del 95% y un  $\alpha = 0.05$ .

## 2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de dilución en micro placa

La determinación de la actividad antimicrobiana fue realizada en los dos extractos obtenidos por los métodos de extracción Soxhlet y maceración y en las fracciones provenientes de la columna cromatográfica bajo presión. La técnica aplicada fue la reportada por Eloff en 1998 y descrito en el *Manual GIBEX Screens to nature* (2014).

El ensayo se desarrolló en placas de 24 pocillos estériles. Se colocaron  $300 \mu\text{L}$  de agar nutritivo en cada uno de los pocillos ya previamente autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  y 1.5 atmósferas por 15 minutos. Dentro de estos se colocaron  $15 \mu\text{L}$  de las muestras junto con  $10 \mu\text{L}$  de la suspensión de microorganismos y se las dejó incubar por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en aerobiosis. Las cepas de microorganismos usadas fueron *Stafilococo aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) facilitadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Como control negativo se usó metanol y como control positivo una solución de 10 mg/ml de Kanamicina. Finalizada la incubación se adicionaron  $15 \mu\text{L}$  de la solución de MTT en cada uno de los pocillos y se incubó nuevamente por 1 hora, pasado el tiempo se procedió con la lectura. El ensayo fue realizado por triplicado.

### III. RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 3.1 Rendimiento de los extractos

El proceso de extracción es uno de los pasos más importantes en la investigación de productos naturales, por lo cual es necesario aplicar varios métodos de extracción para realizar la evaluación de su perfil químico (Martins and da Conceição, 2015). Para la obtención de los extractos de *M. rupestris* que se utilizaron durante todo el trabajo de investigación se llevaron a cabo dos métodos extractivos: Soxhlet y maceración, con el objetivo de comparar su rendimiento, capacidad extractora y conservativa de los constituyentes del material vegetal. De los dos tipos de extractos obtenidos se tomó el peso seco y se analizó el rendimiento obtenido respecto al material vegetal inicial. El metanol fue el solvente escogido para la extracción al ser un solvente que ha demostrado tener una capacidad de extracción exhaustiva. Según Miliauskas *et al* (2003) los extractos metanólicos presentan un atrapamiento de radicales libres de ABTS Y DPPH fuerte, en comparación con extractos obtenidos con acetato de etilo o acetona.

En la Tabla 4 se muestran los resultados del rendimiento de los dos métodos de extracción. El método de extracción Soxhlet muestra tener un mayor rendimiento en comparación del método de maceración. Este resultado coincide con la revisión bibliográfica realizada, en donde se indica que este método a más de encontrarse bien establecido, supera el rendimiento de otras técnicas de extracción, siempre y cuando no exista en su composición compuestos termolábiles (Wang and Weller, 2006). El método de elección para la obtención del extracto metanólico de *M. rupestris* por la superioridad en el rendimiento puede ser considerado el método de Soxhlet, sin embargo se debe tener en consideración que el método de extracción a pesar de tener un rendimiento elevado puede tener deficiencias en la exactitud de extracción de los metabolitos. Inclusive el mismo método pero usado en diferentes materiales vegetales puede requerir de diferentes condiciones de operación, temperatura, o solvente (Ong, 2004).

<b>Método</b>	<b>Peso del material vegetal liofilizado (g)</b>	<b>Peso del extracto concentrado (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<i>Soxhlet</i>	46.92	23.07	49.17
<i>Maceración</i>	100.04	39.28	39.26

Tabla 4. Rendimiento de los extractos de *M. rupestris* obtenidos por los métodos de Soxhlet y maceración.

### 3.2 Fraccionamiento de los extractos de *M. rupestris*

#### 3.2.1 Rendimiento de las fracciones

Los extractos que se obtienen a partir del material vegetal son mezclas complejas, necesitando generalmente una separación y purificación adicional con el fin de obtener la fracción activa (Zhang et al., 2018). Los extractos totales obtenidos por los métodos descritos en los apartados 2.2.1. Extracción por Soxhlet y 2.2.2. Extracción por maceración fueron sometidos a fraccionamiento por columna bajo presión. Los rendimientos de las fracciones obtenidas se presentan en la Tabla 5.

Extracto	Soxhlet		Maceración		
	Fracción	Peso de la fracción seca (g)	Rendimiento (%)	Peso de la fracción seca (g)	Rendimiento (%)
1		0.26	1.13	0.1	0.28
2		0.64	2.77	0.06	0.17
3		0.76	3.29	0.39	1.11
4		1.75	7.59	1.34	3.81
5		1.71	7.10	2.92	8.29
6		3.95	<b>17.12</b>	5.73	<b>16.27</b>

Tabla 5. Rendimiento de las fracciones de los extractos (método Soxhlet y maceración) obtenidas mediante el uso de columnas bajo presión.

De estos extractos, solamente el extracto que se obtuvo mediante el método descrito en el apartado 2.2.2. Extracción mediante uso de maceración, fue fraccionado en la columna abierta por gravedad debido a que era el que se disponía en mayor cantidad. En este fraccionamiento debido a la aparición de bandas coloreadas se obtuvo un total de 10 fracciones, a diferencia del obtenido en las columnas con uso de presión. Las bandas que fueron posibles observar a nivel de la fracción 3, fueron recolectadas en un total de 16 tubos. Estos tubos fueron analizados en CCF (Anexo 5) y se agruparon en un total de 3 grupos (fracción 4, 5 y 6) según la homogeneidad de sus patrones. Sus rendimientos fueron calculados de la misma manera que las fracciones obtenidas por la columna bajo gravedad, resultados que se encuentran en la Tabla 6.

Extracto por Maceración		
Fracción	Peso de la fracción seca (g)	Rendimiento (%)
1	0.11	2.70
2	0.02	0.50
3	0.07	1.72
4	0.10	2.46
5	0.12	2.95
6	0.14	9.83
7	0.22	5.41
8	0.73	17.94
9	1.07	<b>26.29</b>
10	0.47	11.72

Tabla 6. Rendimiento del Fraccionamiento del extracto obtenido por el método de maceración, mediante el uso de columna abierta por gravedad.

El fraccionamiento realizado en los extractos obtenidos por Soxhlet y maceración mediante el uso de las columnas bajo presión, muestran un mayor rendimiento a nivel de las fracciones 6; mientras que el realizado en la columna por gravedad es la fracción 9. Siendo las fracciones con mayor rendimiento aquellas que presentan un grado de polaridad elevado. A pesar de que la cromatografía en columna bajo presión tiene varias ventajas sobre la columna abierta por gravedad como, la obtención de un fraccionamiento en un menor tiempo, por el uso de una menor cantidad de solvente y el brindar una mejor resolución entre las bandas (Poole, 2003) la columna abierta bajo gravedad fue la que presentó un fraccionamiento con un rendimiento superior en la mayoría de las fracciones obtenidas. Esto puede ser explicado debido a que el fraccionamiento en la columna abierta necesita de una mayor cantidad de tiempo para que el sistema de solventes pase a través de toda la columna de vidrio, dando lugar a la posibilidad de monitorizar los componentes coloreados de manera visual durante el desarrollo del fraccionamiento y la apertura de tomar un mayor número de decisiones para obtener un fraccionamiento adecuado, como por ejemplo aumentar el volumen de la fase móvil de la fracción que se está eluyendo, disminuir o aumentar la velocidad de salida de la fracción o eluir con una fase móvil en una proporción adicional a las planeadas desde un inicio (Busia, 2016).

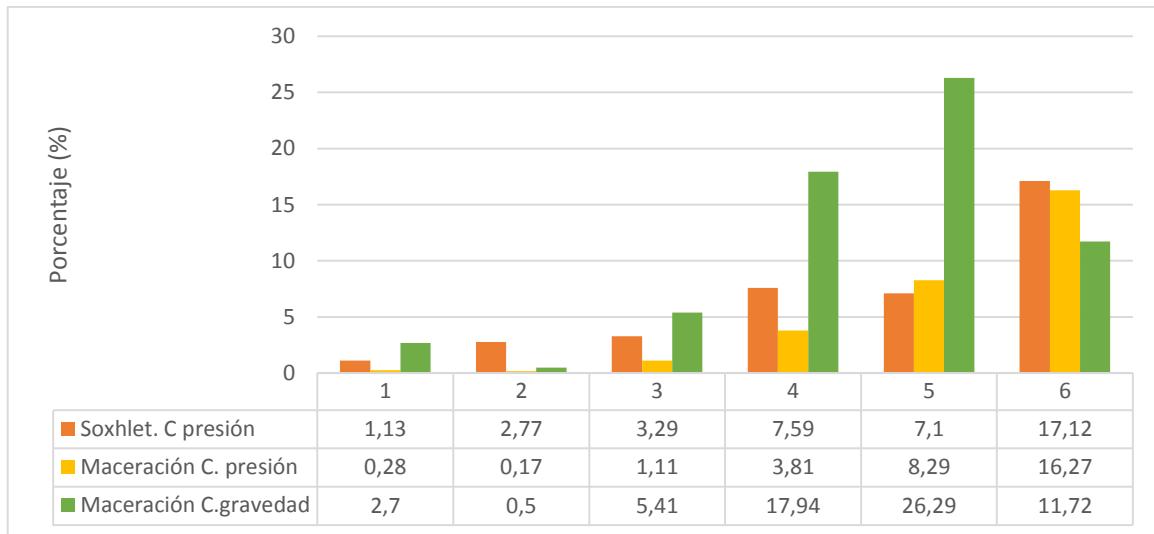
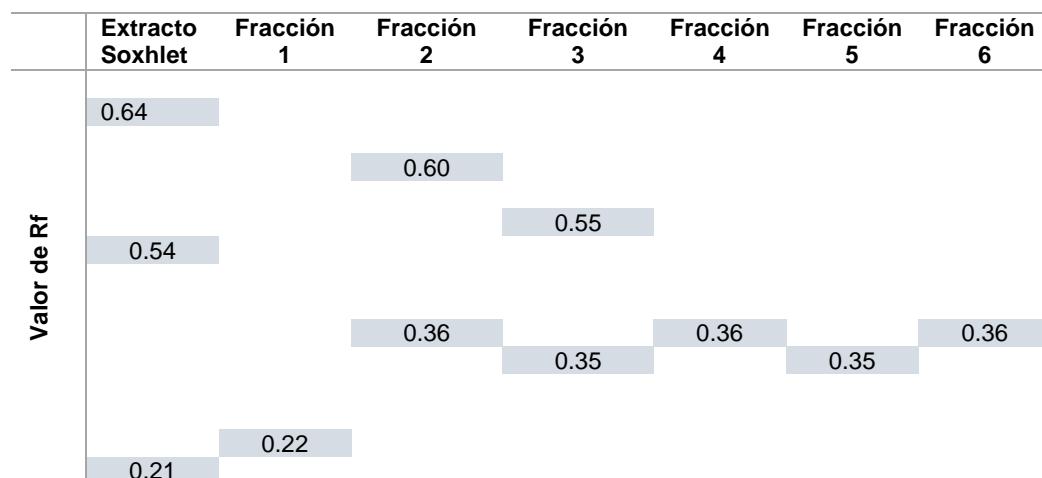


Ilustración 12. Rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna bajo presión (extracto Soxhlet y maceración) y por cromatografía en columna abierta (extracto maceración). Se representan solamente las fracciones con polaridades comparables.

### 3.2.2 Identificación de patrón cromatográfico de fracciones y extractos

Las fracciones obtenidas, según la aplicación de la metodología descrita en el apartado 2.3, fueron tomadas para elaborar una placa resumen en Cromatografía de Capa Fina, junto con los extractos iniciales, y así poder observar el patrón cromatográfico y composición de las fracciones. Como resultado se obtuvieron tres placas, dos de los extractos (Soxhlet y maceración: Ilustraciones 14 y 15 respectivamente) fraccionados en la columna bajo presión y una del extracto de maceración (Ilustración 16) fraccionado en la columna abierta. En cada una de las placas de la CCF, a nivel de los extractos se observan grupos grandes de metabolitos, sin embargo en las fracciones existe la aparición de grupos de metabolitos adicionales como se indica en las tablas 7, 8 y 9



Muestra	Extracto maceración	Fracciones					
		1	2	3	4	5	6
	0.14				0.15	0.15	
		0.12		0.11			

Tabla 7. Valores de  $R_f$  obtenidos en placa resumen del fraccionamiento en columna bajo presión. Extracto por el método de Soxhlet.

Muestra	Extracto maceración	Fracciones					
		1	2	3	4	5	6
	0.58			0.58			
	0.55			0.50			
	0.33			0.37		0.37	0.37
	0.18			0.28			
			0.15				
				0.12	0.12		

Tabla 8. Valores de  $R_f$  obtenidos en placa resumen del fraccionamiento en columna bajo presión. Extracto por el método de maceración.

Muestra	Extracto maceración	Fracciones									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0.79										
	0.74			0.74							
	0.59					0.57					
					0.47						
	0.34										
							0.25	0.25			
									0.24		

Tabla 9. Valores de  $R_f$  obtenidos en placa resumen del fraccionamiento en columna abierta. Extracto por el método de maceración

Según los métodos descritos en el apartado 2.3.2 se obtuvo un mayor número de fracciones mediante la permeación de extracto por maceración en columna abierta. Al obtener un mayor número de fracciones, existe una mayor eficiencia de la separación de los compuestos que constituyen el extracto crudo e inclusive la posibilidad de aislar los componentes en una de las fracciones para su posterior identificación, evidenciado la utilidad del uso de la cromatografía en columna. En esta estrategia de separación existen fundamentos generales en literatura que brindan pautas para el desarrollo de columnas cromatográficas, no obstante el analista debe tener criterio y tomar decisiones lo largo del fraccionamiento con el objetivo de obtener mejores resultados. Como se reporta en trabajos bibliográficos este tipo de cromatografía es útil para reducir la complejidad del extracto crudo y facilitar su aislamiento mediante el fraccionamiento de sus distintos constituyentes, el mismo que, de ser llevado directamente al análisis por HPLC por ejemplo, da por lo general picos coeluidos (Ong, 2004).

En las placas se evidencia que efectivamente existió una separación de los grupos de metabolitos que forman parte del extracto total, ya que a pesar de que en la CCF del extracto se observan pocos valores de  $R_f$ , que posiblemente se deba a la complejidad del extracto y a la coelución de los metabolitos presentes, en la CCF de las fracciones se observa un mayor número de grupos de metabolitos, evidenciado la efectividad que tuvo el fraccionamiento aplicado. Además fue útil para poder determinar que fracción es la responsable de la actividad antioxidante y antimicrobiana que se planteó evaluar al inicio de la investigación, metodología conocida como fraccionamiento bioguiado (Rates, 2001). Estudios similares a estos se han realizado como en el caso de Ficker *et al* (2003) en el que mediante fraccionamiento bioguiado determinaron cuál era la fracción del extracto etanólico de jengibre responsable de la actividad antifúngica para posteriormente aislar el metabolito e identificarlo; o como los reportes realizados por Awad *et al* (2009) en donde la opción preferentemente seleccionada previa a realizar el aislamiento e identificación del fitoquímico responsable de inhibir el metabolismo de la GABA transaminasa presente en el toronjil (*Melissa officinalis L*) fue el fraccionamiento bioguiado por cromatografía en columna.

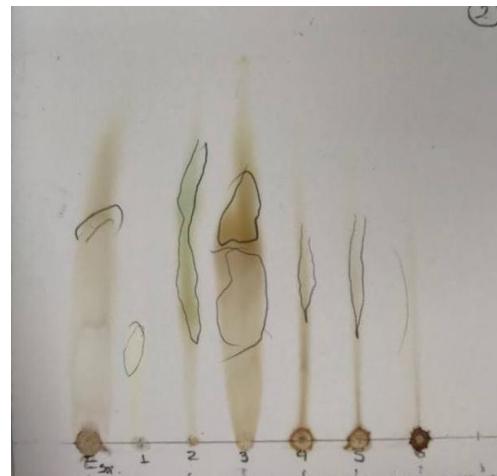


Ilustración 13. Placa resumen del fraccionamiento realizado en columna bajo presión. Extracto obtenido por el método de Soxhlet. Fuente: Autora

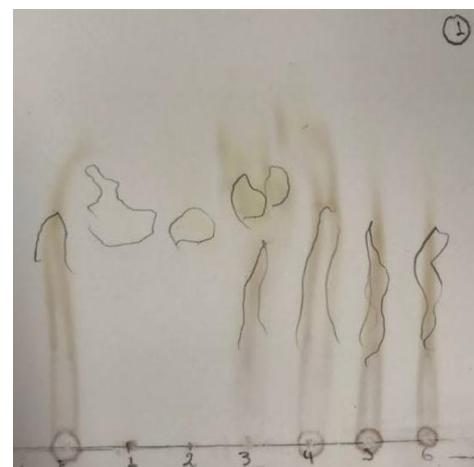


Ilustración 14. Placa resumen del fraccionamiento realizado en columna bajo presión. Extracto obtenido por el método de maceración. Fuente: Autora



Ilustración 15. Placa resumen del fraccionamiento realizado en columna abierta por gravedad. Extracto obtenido por el método de maceración. Fuente: Autora

### 3.4 Estudio de Bioactividad de *M. rupestris*

#### 3.4.1 Actividad antioxidante por el método ABTS

##### 3.4.1.1 Análisis Cualitativo

Los extractos junto con sus fracciones fueron sometidos a la identificación de actividad antioxidante, mediante el método de ABTS. El análisis fue cualitativo con el fin de determinar la existencia o no de la actividad en cada una de las muestras estudiadas. Como el fraccionamiento obtenido en las columnas bajo presión fue similar en los dos extractos (Soxhlet y maceración), se decidió trabajar con las fracciones provenientes de estos dos extractos fin de obtener resultados que puedan ser comparables. Las muestras fueron procesadas como se indicó en el apartado 2.4.1. Determinación cualitativa de actividad antioxidante, dando resultados altamente positivos de actividad antioxidante en el extracto total y en las fracciones 4, 5 y 6 de los extractos obtenidos por los dos métodos de extracción (Tabla 10) (Anexo 6). En este caso se observó una mayor actividad antioxidante a nivel de las fracciones más polares, resultado que indica que los metabolitos responsables de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *M. rupestris* son compuestos polares.

<b>Muestra</b>	<b>Resultado</b>	
	M. Soxhlet	M. Maceración
<i>Control negativo</i>	-	
<i>Control positivo</i>	+++	
<i>Extracto</i>	+++	+++
<i>Fracción 1</i>	-	-
<i>Fracción 2</i>	+	-
<i>Fracción 3</i>	++	++
<i>Fracción 4</i>	+++	+++
<i>Fracción 5</i>	+++	+++
<i>Fracción 6</i>	+++	+++

Tabla 10. Análisis Cualitativo de Actividad antioxidante de los extractos obtenidos por los métodos Soxhlet y maceración.

##### 3.4.1.2 Análisis Cuantitativo

La actividad antioxidante del extracto metanólico de *M. rupestris* fue expresada según la capacidad que tienen las fracciones de atrapar el radical libre ABTS. Este ensayo mostró que el porcentaje de atrapamiento es mucho mayor cuando este se fracciona, por lo que las fracciones presentarán un mayor potencial como antioxidante (Plazas González, 2015). De las tres fracciones ensayadas las que presentan un mayor resultado son las fracciones 6 (fracciones más polares) de los dos tipos de extractos (anexo 7). A pesar de que el porcentaje de atrapamiento del ion ABTS calculado en la fracción 6 del extracto obtenido por el método de Soxhlet (68.33 %), fue mayor al obtenido en el método de maceración (65.15 %), la diferencia en la concentración necesaria para llegar a ese resultado dejan en claro que el método de extracción a elegir para la obtención de la fracción con actividad antioxidante debe ser el de maceración, pues la cantidad necesaria de la fracción para llegar a índices mayores al 50% es mucho menor (3.125 mg/dl) (Tabla 11).

<b>Extracto</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Concentración de los extractos y fracciones usados en el ensayo del método ABTS (mg/ml)</b>					
		100	50	25	12.5	6.25	3.125
<i>Soxhlet</i>	Extracto total	<b>51.11</b>	44.41	14.31	16.63	21.39	32.10
	Fracción 4	<b>54.72</b>	50.48	23.58	24.06	41.18	41.57
	Fracción 5	<b>66.64</b>	50.10	21.33	50.09	57.45	47.02
	Fracción 6	38.77	<b>68.33</b>	28.55	40.20	57.04	60.51
<i>Maceración</i>	Extracto total	34.69	20.72	25.22	33.88	47.7	<b>62.9</b>
	Fracción 4	42.80	13.90	14.04	27.19	21.12	<b>48.25</b>
	Fracción 5	43.34	19.15	23.44	27.73	38.50	<b>55.06</b>
	Fracción 6	42.73	14.04	13.63	39.93	50.09	<b>65.15</b>

Tabla 11. Porcentaje de atrapamiento del ion estable ABTS en extractos totales y fracciones de los extractos metanólicos de *M. rupestris*.

A más de determinar el porcentaje de atrapamiento, se calculó el IC50 que indica la cantidad necesaria de la fracción o extracto para atrapar la mitad de radicales libres del ion ABTS, mismo que se expresó como miligramos de peso seco de la fracción/extracto sobre mililitro. El ensayo se realizó de igual manera en los dos tipos de extractos con el objetivo de comparar las fracciones y determinar cuál de los dos métodos permite obtener un extracto con el mayor número de compuestos bioactivos y como consecuencia con una mayor actividad antioxidante.

Los resultados que se obtuvieron (tabla 12) muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.0001$ ) entre los extractos totales obtenidos por Soxhlet y maceración. La existencia de un valor bajo de IC 50 es indicativo de que la actividad antioxidante es mayor (Echavarría Z et al., 2009) por lo tanto el extracto obtenido por maceración tiene una mayor actividad antioxidante en comparación con el de Soxhlet, concluyéndose que los extractos orgánicos totales de *M. rupestris* no son iguales entre sí. Sin embargo este comportamiento no se cumple a nivel de las fracciones, pues sus valores a pesar de mostrar una diferencia aparente, no es significativa. La positividad de la actividad antioxidante en *M. rupestris* coincide con los resultados hallados previamente por Reyna (2012) y por Jetón (2014).

	<b>IC 50 Soxhlet (mg/ml)</b>	<b>DE (±)</b>	<b>IC 50 Maceración (mg/ml)</b>	<b>DE (±)</b>	<b>p</b>
<b>Extracto total</b>	98.43	1.25	2.83	1.01	0.0001
<b>Fracción 4</b>	42.44	1.4	45.79	1.34	0.4759
<b>Fracción 5</b>	6.07	1.32	50.14	1.23	0.2091
<b>Fracción 6</b>	7.33	0.56	5.11	1.19	0.3440

$p < 0.05$ : Hipótesis nula es rechazada. Se rechaza similitud entre las muestras.

$p > 0.05$ : Hipótesis nula es aceptada. Se acepta similitud entre las muestras.

Tabla 12. Valores de IC 50 para extractos (obtenidos por Soxhlet y maceración) y fracciones positivas a actividad antioxidante.

En la evaluación de la actividad antioxidante de un extracto se ha evidenciado un posible efecto sinérgico entre sus compuestos bioactivos (Echavarría Z et al., 2009). Analizando la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de *M. rupestris* se ha visto un posible efecto sinérgico entre los compuestos bioactivos que posee, existiendo reportes de literatura que hacen referencia al hallazgo mencionado. Tal es el caso del estudio realizado por Espinoza Ruiz et al (2012) sobre el efecto sinérgico de taninos y flavonoides de *Terminalia catappa* sobre los hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en el que evidenció que a pesar de que la inhibición del crecimiento por parte de los taninos fue mayor a la de los flavonoides, el valor de inhibición alcanzado por el extracto total fue mucho mayor, concluyendo que existe un efecto sinérgico entre estos dos compuestos para la inhibición del crecimiento de *R. solani* y *S. rolfsii*.

Existen estudios en los que incluso se han realizado mezclas de extractos de diferentes plantas con el objetivo de observar si es que existe un efecto sinérgico beneficioso entre

los metabolitos secundarios de los mismos y el posible incremento de su bioactividad (Más Toro et al., 2017).

### **3.4.2 Actividad antimicrobiana por el método de dilución en placa**

Las bacterias escogidas para el ensayo antimicrobiano fueron *Escherichia coli* y *Estafilococo aureus*. La bacteria *Escherichia coli*, fue escogida por la frecuencia con la que esta aparece en los brotes de enfermedades transmitidas por los alimenticios, además de que con fines investigativos puede usarse como un sustituto de la bacteria patógena *E. coli* 0157:H7 (Salleh-Mack and Roberts, 2007). De la misma manera *E. aureus* es considerada dentro de las bacterias que más causa enfermedades en los humanos, que aunque por lo general no son muy serias puede llegar a occasionar neumonía, infecciones sanguíneas o a nivel de hueso (Deliorman Orhan et al., 2010).

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y sus fracciones se trabajó con dos cepas diferentes. Primero se realizó con la cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922), leyéndose los resultados a las 24 horas y obteniéndose resultados negativos tanto como para los dos extractos como para su fracciones. Se realizó el experimento por segunda vez con *Estafilococo aureus* (ATCC 25923), volviéndose a obtener resultados negativos (anexo 8). La lectura de los resultados fueron realizados de manera cualitativa, ya que se esperaba realizar la determinación de la IC50 con aquellas fracciones que mostraran un resultado positivo, pero al no tener resultados favorables se descartó la existencia de una posible actividad antimicrobiana ante las bacterias objetivo. A pesar de que existen estudios en los que se reportan resultados positivos para actividad antimicrobiana y antifúngica en extractos con presencia de flavonoides (principales responsables de actividad antioxidante en extractos de plantas) como en la investigación realizada por Deliorman et al (2010), los resultados obtenidos en estos ensayos no fueron similares. Castillo et al (2014) también realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de un extracto, *Morinda citrifolia* L. (noni) en este caso, donde indican la positividad de actividad antibacteriana del extracto de la planta, resultado que explican se debe principalmente a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, quinonas y cumarinas. Todo esto deja una puerta abierta para continuar con las investigaciones alrededor de la especie *M. rupestris* pues no se puede descartar una posible bioactividad sobre el resto de microorganismos. Además de que lamentablemente no existen estudios suficientes sobre la composición fotoquímica de



la misma, dejándonos la pregunta de cuáles son los metabolitos y su mecanismo de acción para la actividad antioxidante.

## IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Determinar los procesos de extracción, separación e identificación que deben ser aplicados a un extracto vegetal es muy importante a la hora de realizar investigación, sobre todo en aquellas especies de las cuales todavía no se posee mucha información. El estudio de las especies vegetales y de los productos que se pueden obtener a partir de ellas ha ido teniendo una mayor acogida en los últimos años. Área de la investigación de gran potencial sobre todo en aquellos países ricos en biodiversidad (Kratchanova et al., 2010).

De los resultados obtenidos a lo largo del trabajo se tiene que a pesar de que el método de extracción Soxhlet presenta un mayor rendimiento y otras ventajas como la necesidad mínima de tiempo comparada con el método de maceración, la calidad del extracto es mucho menor a la obtenida por maceración. El extracto por maceración presentó mejores resultados para la actividad antioxidante, mostrando que con una cantidad mínima del mismo (2.83 mg/ml) se puede llegar al atrapamiento del 50 % de los radicales libres ABTS.

A pesar de que técnicas clásicas como la cromatografía en columna ya no se utiliza con la misma frecuencia que en años anteriores, ésta mostró que sigue siendo un método viable para el fraccionamiento de un extracto crudo, permitiendo separarlo al mismo en sus constituyentes según sus características polares. Los dos tipos de columnas usadas, abierta por gravedad y bajo presión mostraron tener sus ventajas y desventajas. La columna bajo presión resultó ser más rápida y mostró la posibilidad de ser reproducible, sin embargo no permite una mejor separación de los constituyentes del extracto, pues al realizarse de una manera más rápida la separación de las mismas no se puede controlar de una manera adecuada. Contrariamente a la columna abierta pues a pesar de requerir un mayor tiempo y la posibilidad de no tener resultados reproducibles, permite visualizar de una mejor manera la separación del extracto y el albedrio del investigador a realizar cambios en la composición o volumen de los sistemas de solventes usados. Además el rendimiento de las fracciones obtenidas por este tipo de columna resultaron ser superiores al obtenido en la columna bajo gravedad.

El fraccionamiento permitió obtener una pauta de donde se encuentran los metabolitos responsables de la actividad antioxidante que se le otorga a la especie *Macleania rupestris*. La mayor actividad antioxidante se encontró a nivel de la fracción 6 (fraccionamiento en columna por gravedad) y en la fracción 9 (fraccionamiento por columna abierta por gravedad), llegándose a la conclusión de que son metabolitos que poseen grupos polares en su estructura, fracción que en estudios posteriores puede ser usada para un análisis fitoquímico. Sin embargo con estos resultados se observó que la actividad antioxidante a pesar de estar elevada en las fracciones polares, el extracto cuando está en su forma total muestra una mayor actividad antioxidante y no cuando está separado en sus fracciones polares.

Lamentablemente, en la evaluación de la actividad antimicrobiana no se obtuvieron resultados positivos en las dos bacterias objetivo del estudio, *Stafilococo aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Por lo que se descartó la posibilidad de la actividad antimicrobiana para estas dos bacterias. Sin embargo la posibilidad de que efectivamente tenga esta bioactividad no puede ser descartada, siendo un campo de futuras investigaciones.

#### **4.2 Recomendaciones**

Para futuras investigaciones se recomienda trabajar con un extracto obtenido por el método de maceración pues demostró ser el mejor extractivo para la especie *Macleania rupestris*.

El fraccionamiento a usarse pudo ser el de cromatografía en columna abierta bajo gravedad, pues permite tener un mejor fraccionamiento del extracto al permitir al investigador manipular y tomar decisiones durante el proceso.

Continuar con la investigación de las posibles actividades biológicas que esta especie posee, pues aún queda un gran campo en donde indagar.

## V. REFERENCIAS

- Alfonso Méndez, C. (2009). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura: tesis doctoral (Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico).
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B.E., and Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Rev. Salud Pública Nutr.* 3.
- Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., Trudeau, V.L., and Arnason, J.T. (2009). Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother. Res. PTR* 23, 1075–1081.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79.
- Beckett, A.H., and Stenlake, J.B. (1988). *Practical Pharmaceutical Chemistry* (London: The Athlone Press).
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., and Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 218–228.
- Busia, D.K. (2016). *Fundamentals of Herbal Medicine: Major Plant Families, Analytical Methods, Materia Medica* (Xlibris).
- Calvo Cruz, D.S. (2012). *Caracterización Morfológica Y Fisiológica de Semillas Y Plantulas de Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Smith. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., and Arnao, M.B. (2002). On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS<sup>•+</sup> assay. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 7, 103–109.
- Castillo Mompié, A., Pascual Sanchez, Y.M., CunhaNune, L.C., de la Paz Lorente, C., and Cañete Aguila, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). *Rev. Cuba. Plantas Med.* 19, 374–382.
- Cheng, S.-C., Huang, M.-Z., and Shiea, J. (2011). Thin layer chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 2700–2711.

- Corzo Barragán, D.C. (2014). Estudio del Comportamiento Poscosecha de *Macleania rupestris* (Kunth), en diferentes tipos de envases y condiciones de Temperatura. *Rev. Iberoam. Tecnol. Postcosecha* 15, 77–82.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., and Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *J. Ethnopharmacol.* 106, 290–302.
- Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 3670–3695.
- Cranwell, P., Harwood, L.M., and Moody, C.J. (2017). *Experimental Organic Chemistry* (Pondicherry: SPi Global).
- Deliorman Orhan, D., Ozçelik, B., Ozgen, S., and Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* 165, 496–504.
- Díaz Solares, M., Lugo Morales, Y., Fonte Carballo, L., Castro Cabrera, I., López-Vigoa, O., and Montejo Sierra, I.L. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *Pastos Forrajes* 40, 43–48.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660.
- Dominguez Ordoñez, L. (2017). Estudio de la transferencia de masa en cromatografía preparativa, con aplicación en biotecnología.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., and Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1768–1774.
- Durán Casas, S., Veloza Suan, C.M., Magnitskiy, S., and Lancheros, H.O. (2013). Evaluation of uva camarona (*Macleania rupestris* Kunth A.C. Smith) propagation with air layering. *Agron. Colomb.* 31, 18–26.

Echavarría Z, B., Franco S, A., and Martínez M, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae* 16, 126–131.

Espinosa Ruiz, R., Herrera Isla, L., Bravo Sánchez, L.R., Hernandez Aro, M., Torres García, S., Ramos González, Y., and Espinosa Mill, M. (2012). Efecto Sinérgico De Taninos Y Flavonoides Presentes En Terminalia Catappa L. Sobre El Crecimiento Micelial De Rhizoctonia Solani Kühn Y Sclerotium Rolfsii Sacc. *Fitosanidad* 16, 27–32.

Ficker, C., Smith, M.L., Akpagana, K., Gbeassor, M., Zhang, J., Durst, T., Assabgui, R., and Arnason, J.T. (2003). Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother. Res. PTR* 17, 897–902.

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S.I., and Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 24, 1043–1048.

Fuchs, E.J., Ross-Ibarra, J., and Barrantes, G. (2010). Reproductive biology of macleania rupestris (ericaceae), a pollen-limited neotropical cloud-forest species in Costa Rica. *J. Trop. Ecol.* 26, 351–354.

Gallego Picó, A. (2012). Contaminación atmosférica (Madrid: UNED).

García Bacallao, L., Vicente García Gómez, L., Rojo Domínguez, D.M., and Sánchez García, E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev. Cuba. Investig. Bioméd.* 20, 231–235.

Gaviria Montoya, C., Ochoa Ospina, C., Sánchez Mesa, N., Medina Cano, C., Lobo Arias, M., García, P.G., Martínez, A.M., Tenorio, A.T., Pérez, Y.L., and Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromáticas* 8, 519–528.

GIBEX (2014). Manual Screens-to-nature (Global Institute for bioexploration. Rutgers University.).

González Plazas, A.E. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaeas colombianas. *Rev. Cuba. Plantas Med.* 20, 182–199.

- Guzmán A, B., Hernández E, J., Ortega E, S., Viruegas R, R., and Barrita JL, S. (2009). Los nutracéuticos. Lo que es conveniente saber. *Rev. Mex. Pediatría* 76, 136–145.
- Handa, S.S., Singh Khanuja, S.P., Longo, G., and Rakesh, D.D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants (Trieste, Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology).
- Huang, X., Kong, L., Li, X., Chen, X., Guo, M., and Zou, H. (2004). Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 812, 71–84.
- Huie, C.W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 23–30.
- Ingle, K.P., Deshmukh, A.G., Padole, D.A., Dudhare, M.S., Moharil, M.P., and Khelurkar, V.C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6, 32–36.
- Jetón Baculima, J.M. (2014). Desarrollo de Bebidas con capacidad Antioxidante y Antirradicalario a partir de frutos Ecuatorianos. Universidad del Azuay.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., and Roberts, T.H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 18, 2328–2375.
- Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., and Mihailov, A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochim. Pol.* 57, 229–234.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., and Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89, 217–233.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., and Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci. Technol.* 25, 726–732.
- Lagos-Burbano, T.C., Ordóñez-Jurado, H., Criollo-Escobar, H., Burbano, S., and Martínez, Y. (2010). Descripción de frutales nativos de la familia Ericaceae en el altiplano de Pasto, Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Hortícolas* 4, 9–18.
- Luengo Fernández, E. (2007). Alimentos funcionales y nutracéuticos.

- Luteyn, J.L. (2002). Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. *Bot. Rev.* 68, 55–87.
- Mahesh, B., and Satish, S. (2008). Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. *World J. Agric. Sci.* 839–843.
- Martins, F.S., and da Conceição, E.C. (2015). Evaluation of extraction method on the chemical composition in Apeiba tibourbou Aubl's extracts. *Pharmacogn. Mag.* 11, 368–373.
- Más Toro, D., Martínez Aguilar, Y., Rodríguez Bertot, R., Pupo Torres, G., Rosabal Nava, O., and Olmo González, C. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Rev. Cuba. Plantas Med.* 22, 0–0.
- Meyers, C.L.F., and Meyers, D.J. (2008). Thin-Layer Chromatography. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 34, A.3D.1-A.3D.13.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85, 231–237.
- Mosquera M, O.M., Niño O, J., Correa, Y.M., and Buitrago Bejarano, D.C. (2005). Estandarización del Método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos Vegetales. *Sci. Tech.* 1.
- Nikolai, S. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Bogotá D.C: Convenio Andrés Bello).
- Nyiredy, S. (2004). Separation strategies of plant constituents—current status. *J. Chromatogr. B* 812, 35–51.
- Ong, E.S. (2004). Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 812, 23–33.
- Palomo G, I., Gutiérrez C, M., Astudillo S, L., Rivera S, C., Torres U, C., Guzmán J, L., Moore-Carrasco, R., Carrasco S, G., and Alarcón L, M. (2009). Efecto Antioxidante de Frutas y Hortalizas de la zona central de Chile. *Rev. Chil. Nutr.* 36, 152–158.
- Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K., and Liu, P. (2010). Antioxidant activity of microwave-assisted extract of Buddleia officinalis and its major active component. *Food Chem.* 121, 497–502.

- Parekh, J., Karathia, N., and Chanda, S. (2006). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. *Afr. J. Biomed. Res.* 9.
- Patel, V., Patel, P., and Kajal, S.S. (2010). Antioxidant activity of some selected medicinal plants in Western region of India. *Adv. Biol. Res.* 4, 23–26.
- Pedersen, D.S., and Rosenbohm, C. (2001). Dry Column Vacuum Chromatography. *Synthesis 2001*, 2431–2434.
- Plazas González, E.A. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaeas colombianas. *Rev. Cuba. Plantas Med.* 20, 182–199.
- Pool, C. (2003). *The Essence of Chromatography* (Elsevier Science).
- Ramirez, L.S., and Castaño, D.M. (2009). *Metodologias Para Evaluar in Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal*. *Sci. Tech. XV*, 263–268.
- Rates, S.M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 39, 603–613.
- Restrepo Sánchez, D.-C., Narváez Cuenca, C.-E., and Restrepo Sánchez, L.-P. (2009). Extraction of compounds with antioxidant activity in guava (*Psidium guajava* L.) fruit produced in Vélez-Santander, Colombia. *Quím. Nova* 32, 1517–1522.
- Reyes Jurado, F., Palou, E., and López Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales – TSIA. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 8, 68–78.
- Reyna Achi, C.E. (2012). Evaluacion de la capacidad Antioxidante de Joyapa (*Macleania rupestris*), y aplicación en el procesamiento de alimentos. Universidad del Azuay.
- Rojano, B.A., Gaviria, C.A., Gil, M.A., Saez, J.A., Schinella, G., and Tournier, H. (2008). Actividad Antioxidante Del Isoespintanol En Diferentes Medios. *Vitae* 15, 173–181.
- Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., and Kamiński, M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 253–261.

- Saeed, N., Khan, M.R., and Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 221.
- Salleh-Mack, S.Z., and Roberts, J.S. (2007). Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrason. Sonochem.* 14, 323–329.
- Santiago, M., and Strobel, S. (2013). Thin layer chromatography. *Methods Enzymol.* 533, 303–324.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., and Yoga Latha, L. (2010). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8, 1–10.
- Sauceda, E.N.R. (2011). Uso De Agentes Antimicrobianos Naturales En La Conservación De Frutas Y Hortalizas. *Ra Ximhai* 7, 153–170.
- Shusterman, A.J., McDougal, P.G., and Glasfeld, A. (1997). Dry-Column Flash Chromatography. *J. Chem. Educ.* 74, 1222.
- Still, W.C., Kahn, M., and Mitra, A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 43, 2923–2925.
- Tortzen, C. (2008). A Short guide to Dry Column Vacuum Chromatography (DCVC). 4.
- Valenzuela B, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., and Morales I, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Rev. Chil. Nutr.* 41, 198–204.
- Veloza, C., Durán, S., Magnitskiy, S., and Lancheros, H. (2014). Rooting Ability of Stem Cuttings of *Macleania rupestris* Kunth A.C. Sm., a South American Fruit Species. *Int. J. Fruit Sci.* 14, 343–361.
- Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., and Campaña Marrero, I.R. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Méd.* 21, 171–186.
- Wang, L., and Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 300–312.



Wijesekera, R.O.B. (1991). The Medicinal Plant Industry (Rajagiriya: CRC Press).

Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., and Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin. Med.* 13, 20.

## VI. ANEXOS



Anexo 1. Fruto de *M. rupestris*. **A:** Fruto liofilizado. **B:** Fruto pulverizado.



Anexo 2. Fraccionamiento en Columna abierta bajo gravedad. Se observa la formación de varias bandas a lo largo de la columna.

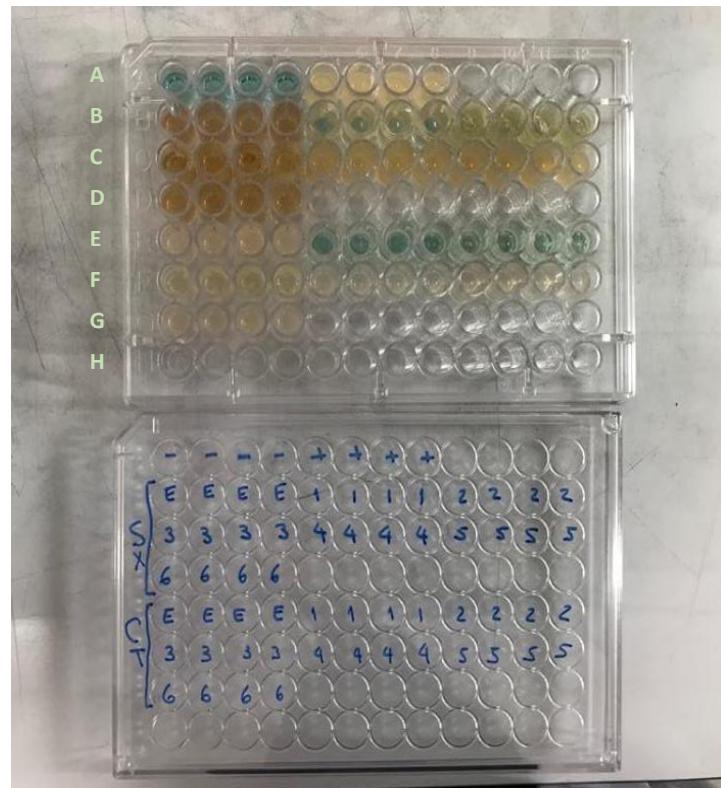


Anexo 3. Fracciones obtenidas después de la aplicación de la Cromatografía en Columna bajo Presión. Fracciones de 1 a 6.

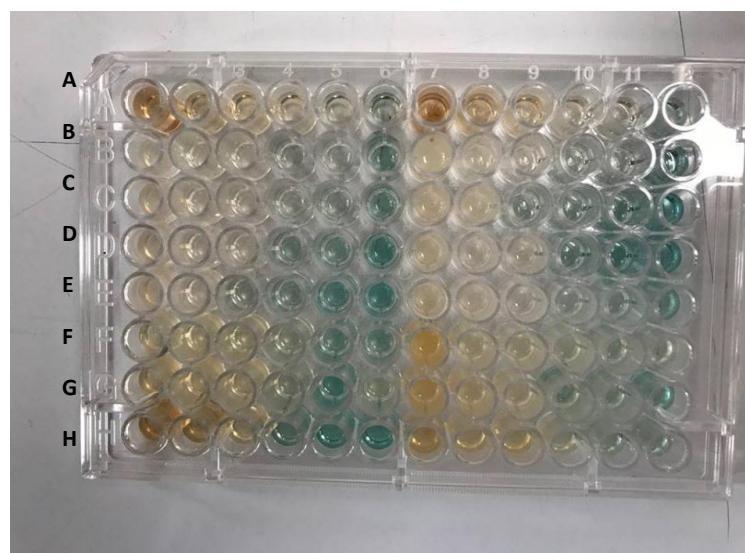


*Anexo 4. Fracciones de los extractos orgánicos obtenidos en columna abierta por gravedad usados para la evaluación de la bioactividad.*

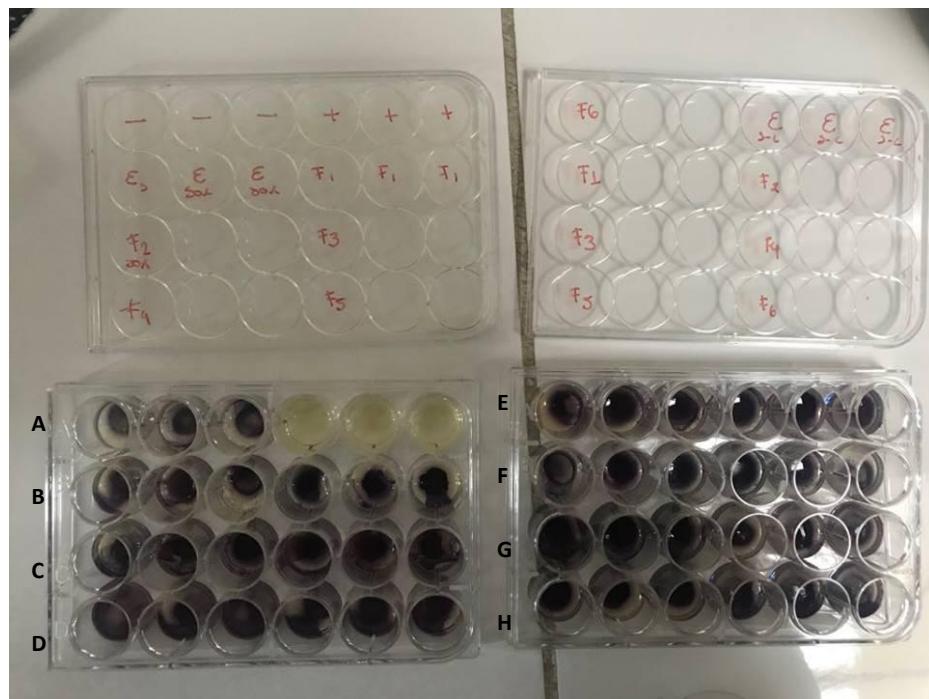
#### Anexo 5. Placa resumen en CCF de tubos colectados en la fracción 3.



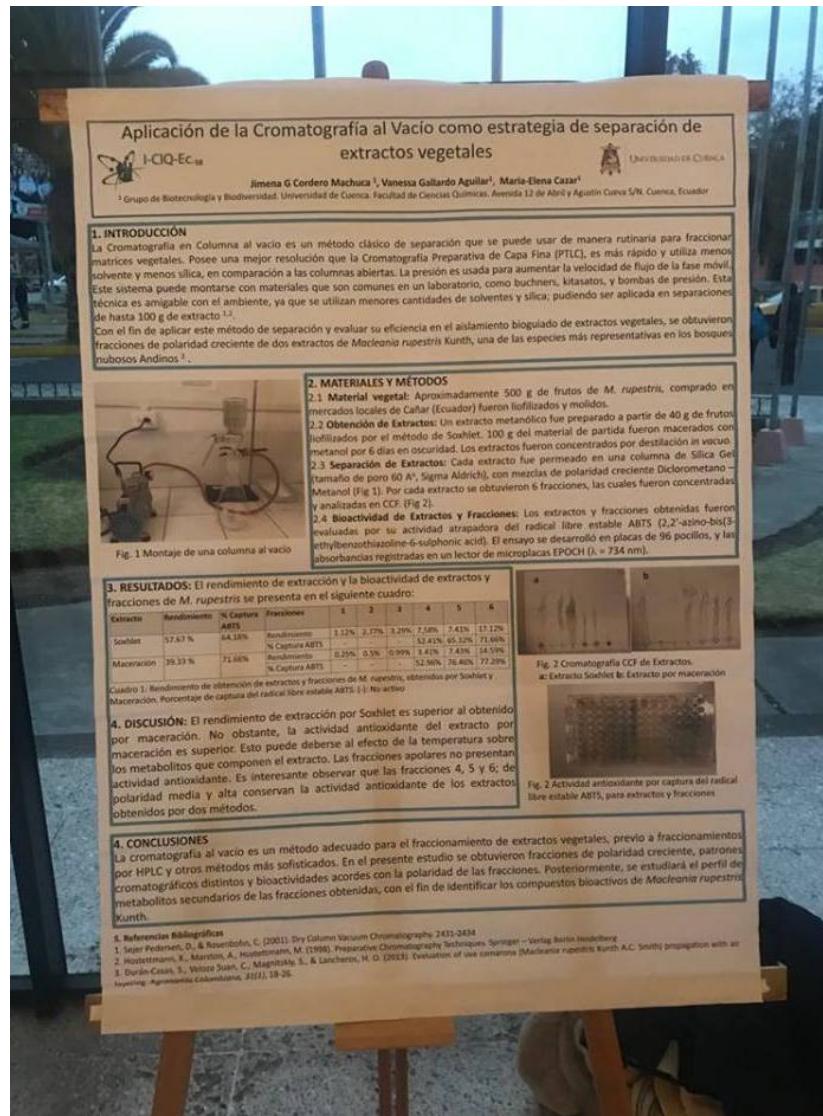
Anexo 6. Placa de 96 pocillos usada para la evaluación de actividad Antioxidante de *M. rupestris*. Ensayo Cualitativo realizado por cuadriplicado. **A:** Controles positivos y negativos respectivamente. **B:** Extracto por Mét. Soxhlet, junto con sus fracciones 1 y 2. **C:** Fracciones 3, 4 y 5. **D:** Fracción 6. **E:** Extracto Mét. Maceración junto con sus fracciones 1 y 2. **F:** Fracciones 3, 4 y 5. **G:** Fracción 6.



Anexo 7. Placa de 96 pocillos usada para la evaluación de la Actividad Antioxidante de *M. rupestris*. Ensayo Cuantitativo. Diluciones seriadas (100 – 3.125 mg/dl) de extractos y fracciones con actividad positiva. **A:** Extracto por Mét. Maceración. **B:** Fracción 4. **C:** Fracción 5. **D:** Fracción 6. **E:** Extracto por Mét. Soxhlet. **F:** Fracción 4. **G:** Fracción 5. **H:** Fracción 6.



Anexo 8. Placa de 24 pocillos usada para evaluación de Actividad Antimicrobiana de extractos de *M. rupestris* realizado por triplicado. **A:** Controles negativo y positivo respectivamente. **B:** Extracto por Mét. Soxhlet y Fracción 1. **C:** Fracciones 2 y 3. **D:** Fracciones 4 y 5. **E:** Fracción 6 y Extracto por Mét. Maceración. **F:** Fracción 1 y 2. **G:** Fracción 3 y 4. **H:** Fracción 5 y 6.



Anexo 9. Poster "Aplicación de la Cromatografía al Vacío como estrategia de Separación de Extractos Vegetales" presentado en el 1º Congreso Internacional de Química – Ecuador 2018., basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.