



**Evaluación de la composición metabólica y carácter antioxidante de las hojas, flores y frutos que pertenecen a las especies de arupo rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth) y blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo)**

Espinoza Caiza, Iván Alejandro

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Raluca Mihai, Ph.D.

16 de febrero, 2023

## Informe de originalidad

---

### NOMBRE DEL CURSO

Revisión Tesis



IDENTIFICACION DEL ALUMNO

RALUCA ALEXANDRA

MIHAI

### NOMBRE DEL ALUMNO

IVAN ALEJANDRO ESPINOZA CAIZA

### NOMBRE DEL ARCHIVO

IVAN ALEJANDRO ESPINOZA CAIZA - Documento sin título

### SE HA CREADO EL INFORME

15 feb 2023

## Resumen

|                                      |   |       |
|--------------------------------------|---|-------|
| Fragmentos marcados                  | 7 | 1 %   |
| Fragmentos citados o entrecomillados | 1 | 0,1 % |

### Coincidencias de la Web

|             |   |       |
|-------------|---|-------|
| utn.edu.ec  | 6 | 0,9 % |
| uasb.edu.ec | 1 | 0,1 % |
| scielo.cl   | 1 | 0,1 % |

1 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

El arupo rosado es **originario de la región andina**, precisamente del **sur de Ecuador y norte de Perú**. Incluso es encontrado en algunas regiones ubicadas al sur...

#### Mejor coincidencia en la Web

ornamental **originario de la región andina (sur de Ecuador y norte de Perú)** cuyo florecimiento anual (entre abril y septiembre) cubre la ...

Graffiti, postgraffiti y reconfiguración urbana - Repositorio

UASB <https://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/7340/1/T3213-MEC-Onoa-Graffiti.pdf>

2 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

**ABTS Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico Colorimetría**

#### Mejor coincidencia en la Web

**ABTS Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico Colorimetría** FRAP Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III) Colorimetría

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE - Repositorio

UTN <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11300/2/03%20EIA%20524%20TRABAJO%20GARDO.pdf>

3 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno [MARCADO](#)

**PFRAP Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y luego reacción de ferrocianuro de potasio con Fe<sup>3+</sup> Colorimetría**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

**PFRAP Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y posterior reacción de ferrocianuro de potasio con Fe<sup>3+</sup> + Colorimetría CUPRAC Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes Colorimetría...**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE - Repositorio

UTN <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11300/2/03%20EIA%20524%20TRABAJO%20GARDO.pdf>

4 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno [MARCADO](#)

**CUPRAC Reducción de Cu (II) a Cu(I) por antioxidantes Colorimetría**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

PFRAP Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y posterior reacción de ferrocianuro de potasio con Fe<sup>3+</sup> + Colorimetría **CUPRAC Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes Colorimetría...**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE - Repositorio

UTN <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11300/2/03%20EIA%20524%20TRABAJO%20GARDO.pdf>

5 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno [MARCADO](#)

**HORAC Capacidad antioxidante para apagar los radicales OH producidos por un sistema tipo Fenton basado en Co(II) Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína TRAP Capacidad...**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

**HORAC Capacidad antioxidante para extinguir los radicales OH generados por un sistema similar a Fenton basado en Co (II) Pérdida de fluorescencia de fluoresceína. TRAP Capacidad antioxidante para...**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE - Repositorio

UTN <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11300/2/03%20EIA%20524%20TRABAJO%20GARDO.pdf>

6 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno [MARCADO](#)

**Fluorimetría Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética de una longitud de onda diferente. Grabación...**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

TRAP Capacidad antioxidante para eliminar radicales derivados de luminol, generados a partir de la descomposición de AAPH Temple de quimioluminiscencia **Fluorimetría Emisión de luz por una sustancia...**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE - Repositorio

UTN <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11300/2/03%20EIA%20524%20TRABAJO%20GARDO.pdf>

7 de 8 fragmentos

15/2/23, 19:06

Trabajo de Titulación Estudiante

Fragmento del alumno [MARCADO](#)

**Cromatografía Cromatografía de gases Separación de compuestos mediante una fase estacionaria líquida y una fase móvil gaseosa Ionización de llama o detección de conductividad térmica**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

**Cromatografía Cromatografía de gases** La separación de los compuestos en una mezcla se basa en la distribución entre una fase líquida estacionaria y una fase móvil gaseosa Detección de ionización de...

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE - Repositorio

UTN <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11300/2/03%20EIA%20524%20TRABAJO%20GARDO.pdf>

8 de 8 fragmentos

Fragmento del alumno [CITADO](#)

Se empleó el **método de pH diferencial adaptado por Barragán et al. (2021)**.

[Mejor coincidencia en la Web](#)

**método de pH diferencial adaptado por (Barragán et al., 2018)**; para el cual se ha usado dos sistemas buffer: cloruro de potasio (KCl) pH 1.0 (0.025 M) y acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) pH 4.5 (0.4 M...

Antocianinas y capacidad antioxidante en extractos de frutos secos

... <https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v32n5/0718-0764-infotec-32-05-3.pdf>

Fragmento adaptado por:  
RALUCA ALEXANDRA  
MIHAI .



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “Evaluación de la composición metabólica y carácter antioxidante de las hojas, flores y frutos que pertenecen a las especies de arupo rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth) y blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo)” fue realizado por el señor Espinoza Caiza, Iván Alejandro el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de febrero del 2023



Escaneado electrónicamente por:  
RALUCA ALEXANDRA  
MIHAI .

Raluca Alexandra Mihai, Ph.D.

C.I. 1757487507



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Espinoza Caiza, Iván Alejandro**, con C.C. **1724686272**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación de la composición metabólica y carácter antioxidante de las hojas, flores y frutos que pertenecen a las especies de arupo rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth) y blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo)"** es de mi auditoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 16 de febrero del 2023

---

**Espinoza Caiza Iván Alejandro**

**C.C. 1724686272**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura  
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de publicación**

Yo, **Espinoza Caiza, Iván Alejandro**, con C.C. **1724686272**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de la composición metabólica y carácter antioxidante de las hojas, flores y frutos que pertenecen a las especies de arupo rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth) y blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 16 de febrero del 2023

---

**Espinoza Caiza Iván Alejandro**

**C.C. 1724686272**

### **Dedicatoria**

Para mis padres, Iván Espinoza y Norma Caiza, y mi hermana Gabriela, que gracias a su amor, sacrificio y apoyo a lo largo de mi vida me han guiado hasta este punto. La persona que soy hoy y muchos de mis logros son gracias y para ustedes.

A Anahi Avila, por acompañarme y alentarme gran parte de la carrera. Por acompañarme, confiar en mí y apoyarme durante esta etapa.

A mí, por las decisiones, el esfuerzo y el deseo de seguir adelante que me han llevado a este punto, y que me seguirán guiando.

**Iván Alejandro Espinoza Caiza**

## Agradecimientos

Agradezco a mi Padre, Iván, por ser mi ejemplo de esfuerzo, responsabilidad y compromiso, valores que atesoro y hoy tengo presente día a día. Cada avance y logro se lo debo a su amor, protección, apoyo y compañía mientras crecí. Seguiré adelante para enorgullecerte y recompensar la persona que soy gracias a ti.

A mi Madre, Norma, que me ha acompañado desde mi primer respiro, amándome durante cada etapa que he vivido. Por educarme, ayudarme y apoyarme cuando más lo necesité. Por grabar en mi mente las palabras “Sé el mejor”, motivación que me ha permitido avanzar. Sin ti querida madre varios de mis éxitos no serían posibles.

A mi Hermana, Gabriela, con quien he compartido alegrías y tristezas, por las anécdotas que conocemos y que al día de hoy siguen sacándonos sonrisas. Gracias por escucharme y darme fuerzas para seguir adelante cuando lo he necesitado, por ser una razón de seguir adelante y ser un ejemplo que puedas seguir.

A Anahi, mi corazón, por ser mi compañera, mi mejor amiga, mi apoyo incondicional y mi amor universitario, que marcó un antes y un después en esta etapa. Por alentarme en mis propósitos, enorgullecerte de mis triunfos y confiar en mis capacidades durante este trayecto. Gracias por acompañarme en este viaje y permitirme ser parte del tuyo, hemos creado recuerdos, alegrías y experiencias que nos han hecho crecer, instantes que siempre estarán en mi mente y corazón.

Para mis amigos de vida: David, Danilo, Nicolás, Eric y Karly. A pesar de la intermitencia durante la universidad por las diversas responsabilidades de cada uno, han formado parte de mí y siempre han estado cuando los he necesitado. “No está mal la vida que llevamos hermanos, ojalá nunca cambie, y ojalá no nos cambie a nosotros”.

A mis amigos de universidad, Oscar, Aby, César, Andrés, Gaby, Christian, Jean, Alexis, Alejandro y Jorge, con quienes he compartido esta larga aventura y me he desvelado, aprendido, reído, llorado y

celebrado. A ustedes que me han apreciado como soy y a quienes espero tener presente en el futuro.

A mis compañeras de laboratorio, Erly y Vanessa, quienes me acompañaron durante la elaboración de este trabajo y lo hicieron más llevadero. Gracias por la paciencia y el conocimiento que compartieron.

A la doctora Raluca Mihai, mi tutora y docente, que supo abrirme las puertas a este y otros proyectos. Gracias por confiar en mí, por el conocimiento impartido y la oportunidad de haber trabajado con usted. A sido una gran maestra y guía, me ha apoyado en varias ocasiones, sin usted no podría haber culminado este trabajo.

A todos los que compartieron conmigo esta etapa universitaria, docentes y amigos, me han dejado varias experiencias. El impacto que dejan y yo les dejo sin duda nos moldea como personas. Gracias.

**Iván Alejandro Espinoza Caiza**

## Índice de contenidos

|   |    |
|---|----|
| Capítulo I: Introducción .....                                | 21 |
| Antecedentes .....  | 21 |
| Justificación del problema .....                              | 23 |
| Objetivos del proyecto.....                                   | 25 |
| Objetivo general .....  | 25 |
| Objetivo específico.....                                      | 25 |
| Hipótesis del proyecto .....                                  | 25 |
| Capítulo II: Marco referencial .....                          | 26 |
| Género <i>Chionanthus</i> .....                               | 26 |
| Clasificación taxonómica.....                                 | 27 |
| Descripción botánica.....                                     | 28 |
| Origen y distribución.....                                    | 30 |
| Arupos en Ecuador.....  | 30 |
| Metabolitos secundarios.....                                  | 31 |
| Metabolitos secundarios en el género <i>Chionanthus</i> ..... | 32 |
| Capacidad antioxidante .....                                  | 33 |
| Mecanismo operativo de los antioxidantes .....                | 34 |
| Iniciación .....  | 35 |
| Propagación .....   | 35 |
| Terminación .....   | 35 |
| Métodos para la determinación del carácter antioxidante ..... | 36 |

|  |    |
|--|----|
|  | 12 |
| Metabolitos con capacidad antioxidante .....                     | 38 |
| Capítulo III: Metodología .....                                  | 40 |
| Obtención del material vegetal.....                              | 40 |
| Tratamiento de muestras .....                                    | 40 |
| Extracción de principios activos .....                           | 40 |
| Determinación del carácter antioxidante por el método DPPH ..... | 40 |
| Determinación del carácter antioxidante por el método ABTS.....  | 41 |
| Determinación del carácter antioxidante por el método FRAP.....  | 42 |
| Determinación del contenido de fenoles totales (TPC).....        | 42 |
| Determinación del contenido de flavonoides totales (TFC) .....   | 43 |
| Determinación del contenido de antocianinas totales (CAT) .....  | 43 |
| Determinación del peso seco .....                                | 44 |
| Análisis estadístico .....                                       | 44 |
| Factores de estudio y unidad experimental .....                  | 44 |
| Tratamientos.....  | 44 |
| Esquema de análisis de varianza .....                            | 46 |
| Capítulo IV: Resultados .....                                    | 48 |
| Obtención y tratamiento del material vegetal .....               | 48 |
| Obtención de los extractos etanólicos .....                      | 49 |
| Evaluación del carácter antioxidante .....                       | 49 |
| Determinación del carácter antioxidante por el método DPPH ..... | 49 |
| Determinación del carácter antioxidante por el método ABTS.....  | 53 |

|   |    |
|---|----|
| Determinación del carácter antioxidante por el método FRAP..... | 56 |
| Determinación del contenido de fenoles totales .....            | 59 |
| Determinación del contenido de flavonoides totales .....        | 62 |
| Determinación del contenido de antocianinas totales.....        | 65 |
| Correlación de Pearson entre ensayos.....                       | 68 |
| Determinación del peso seco.....                                | 69 |
| Capítulo V: Discusión de los resultados .....                   | 71 |
| Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones .....               | 78 |
| Conclusiones.....   | 78 |
| Recomendaciones.....  | 79 |
| Bibliografía.....   | 80 |
| Apéndices .....   | 91 |

### Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica del arupo rosado ( <i>Chionanthus pubescens</i> Kunth) .....  | 27 |
| <b>Tabla 2</b> Clasificación taxonómica del arupo blanco ( <i>Chionanthus Virginicus</i> Linneo) .....  | 28 |
| <b>Tabla 3</b> Métodos analíticos para la evaluación de la capacidad antioxidante por categorías .....  | 37 |
| <b>Tabla 4</b> Diseño experimental factorial para la determinación del contenido de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides y antocianinas totales..... | 45 |
| <b>Tabla 5</b> Diseño experimental factorial del Arupo Rosado ( <i>Ch. pubescens</i> K.) para la determinación del carácter antioxidante.....                 | 45 |
| <b>Tabla 6</b> Esquema del ANOVA para el diseño factorial mixto 2x3 y 3 <sup>2</sup> propuesto .....  | 46 |
| <b>Tabla 7</b> Nomenclatura de las muestras evaluadas de las dos especies del género <i>Chionanthus</i> .....   | 48 |
| <b>Tabla 8</b> Resumen de pesos frescos y secos de muestras de arupo rosado y blanco .....  | 70 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> <i>Miembros del género Chionanthus: A) Ch. retusus, B) Ch. virginicus y C) Ch. pubescens</i> .....              | 27 |
| <b>Figura 2</b> <i>Flores rosadas y blancas dispuestas en panículas de A) Ch. pubescens y B) Ch. virginicus</i> ....            | 29 |
| <b>Figura 3</b> <i>Muestras recolectadas de arupo rosado (Ch. pubescens K.) y arupo blanco (Ch. virginicus L.)</i> .....        | 48 |
| <b>Figura 4</b> <i>Extractos etanólicos y diluciones de muestras recolectadas de arupo rosado y blanco</i> .....                | 49 |
| <b>Figura 5</b> <i>Método DPPH aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco</i> 50                | 50 |
| <b>Figura 6</b> <i>Capacidad antioxidante (% de inhibición) de muestras de arupo rosado y blanco por método DPPH</i> .....      | 51 |
| <b>Figura 7</b> <i>Resumen de medidas descriptivas de la capacidad antioxidante de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....  | 51 |
| <b>Figura 8</b> <i>Análisis de varianza no paramétrica de la capacidad antioxidante por el método DPPH</i> .....                | 52 |
| <b>Figura 9</b> <i>Comparación de medianas de la capacidad antioxidante por el método DPPH</i> .....                            | 52 |
| <b>Figura 10</b> <i>Método ABTS aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....            | 53 |
| <b>Figura 11</b> <i>Capacidad antioxidante (% de inhibición) de muestras de arupo rosado y blanco por método ABTS</i> .....     | 54 |
| <b>Figura 12</b> <i>Resumen de medidas descriptivas de la capacidad antioxidante de muestras de arupo rosado y blanco</i> ..... | 55 |
| <b>Figura 13</b> <i>Análisis de varianza no paramétrica de la capacidad antioxidante por el método ABTS</i> ....                | 55 |
| <b>Figura 14</b> <i>Comparación de medianas de la capacidad antioxidante por el método ABTS</i> .....                           | 56 |
| <b>Figura 15</b> <i>Método FRAP aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....            | 56 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 16</b> <i>Potencial reductor del ión férrico de muestras de arupo rosado y blanco por método FRAP</i> .....                    | 57 |
| <b>Figura 17</b> <i>Resumen de medidas descriptivas de la capacidad antioxidante de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....          | 58 |
| <b>Figura 18</b> <i>Análisis de varianza no paramétrica del potencial reductor del ión férrico por el método FRAP</i> .....              | 58 |
| <b>Figura 19</b> <i>Comparación de medianas del potencial reductor por el método FRAP</i> .....  | 59 |
| <b>Figura 20</b> <i>Ensayo F-C aplicado a extractos etanólicos (1:8) de muestras de arupo rosado y blanco</i> ...                        | 59 |
| <b>Figura 21</b> <i>Contenido de fenoles totales (TPC) de muestras de arupo rosado y blanco por método F-C</i> .....                     | 60 |
| <b>Figura 22</b> <i>Resumen de medidas descriptivas de TPC de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....                                | 61 |
| <b>Figura 23</b> <i>Análisis de varianza no paramétrica del contenido total de fenoles por el método F-C</i> .....                       | 61 |
| <b>Figura 24</b> <i>Comparación de medianas del contenido de fenoles totales por el método F-C</i> .....                                 | 62 |
| <b>Figura 25</b> <i>Ensayo de <math>AlCl_3</math> aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....   | 62 |
| <b>Figura 26</b> <i>Contenido de flavonoides totales (TFC) de muestras de arupo rosado y blanco por ensayo <math>AlCl_3</math></i> ..... | 63 |
| <b>Figura 27</b> <i>Resumen de medidas descriptivas de TFC de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....                                | 64 |
| <b>Figura 28</b> <i>Análisis de varianza no paramétrica del contenido total de flavonoides por el método <math>AlCl_3</math></i> .....   | 65 |
| <b>Figura 29</b> <i>Comparación de medianas del contenido de flavonoides totales por el método <math>AlCl_3</math></i> .....             | 65 |
| <b>Figura 30</b> <i>Ensayo de diferencial de pH aplicado a muestras frescas de arupo rosado y blanco</i> .....                           | 66 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 31</b> <i>Resumen de medidas descriptivas de CAT en muestras (flores y frutos) de arupo rosado y blanco</i> .....  | 66 |
| <b>Figura 32</b> <i>Contenido de antocianinas totales (CAT) de muestras de arupo rosado y blanco</i> .....   | 67 |
| <b>Figura 33</b> <i>Análisis de varianza no paramétrica del CAT por el método de diferencial de pH</i> .....   | 68 |
| <b>Figura 34</b> <i>Comparación de medianas del contenido de antocianinas totales por el método de diferencial de pH</i> .....   | 68 |
| <b>Figura 35</b> <i>Coefficientes de correlación de Pearson aplicados a los métodos de determinación del carácter antioxidante y composición metabólica (TPC, TFC y CAT)</i> ..... | 69 |

### Índice de abreviaturas

**PSM** metabolitos secundarios de las plantas

**ROS** especies reactivas del oxígeno

**cm** centímetros

**m** metros

**TPC** total phenolic content

**TFC** total flavonoid content

**Fw** fresh weight - peso fresco (muestra fresca)

**Dw** Dry weight – peso seco (muestra seca)

**Ac** ácido

**GAE** equivalentes de ácido gálico

**DMF** dimetil formamida

**AH** antioxidante

**BHA** hidroxianisol butilato

**BHT** tolueno hidroxibutilato

## Resumen

El género *Chionanthus* L. agrupa aproximadamente 140 especies, nativas en su mayoría de zonas tropicales a subtropicales en distintas de partes de Asia, Australia, las Américas y África. El Ecuador cuenta con dos especies principalmente utilizadas como plantas ornamentales, *Chionanthus pubescens* K. (arupo rosado) especie nativa del sur del país, y *Chionanthus virginicus* L. (arupo blanco) una especie introducida nativa del sureste de Norte América. El arupo blanco cuenta con algunos estudios previos describiendo sus metabolitos secundarios con actividad antioxidante, mientras que el arupo rosado no ha sido abordado. En este estudio se evaluó la actividad antioxidante (métodos DPPH, ABTS y FRAP), el contenido de fenoles (método Folin-Ciocalteu), flavonoides (método con  $AlCl_3$ ) y antocianinas (método de diferencial de pH) presentes en extractos etanólicos de hojas, flores y frutos de ambas especies. El mejor carácter antioxidante lo presentaron las hojas de *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L., al igual que el mayor contenido total de fenoles (2845,55 mg GAE/100 g fw y 2386,17 mg GAE/100 g fw), y flavonoides (60,758 mg QE/g fw y 67,242 mg QE/g fw), respectivamente. El contenido total de antocianinas determinó un mayor contenido en flores de arupo rosado respecto al resto de muestras. El análisis estadístico de los ensayos determinó que no hay una diferencia significativa entre cada muestra de las especies del género *Chionanthus* evaluadas, a excepción del contenido de antocianinas en flores. Se determinó que *Ch. pubescens* K. es una posible fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes que podrían aprovecharse como las de su pariente norteamericano (*Ch. virginicus* L.).

*Palabras clave:* *Chionanthus*, arupo, carácter antioxidante, fenoles, flavonoides, antocianinas

### Abstract

The genus *Chionanthus* L. groups approximately 140 species, mostly native to tropical and subtropical zones from different parts of Asia, Australia, America and Africa. In Ecuador there are two species mainly used as ornamental plants, *Chionanthus pubescens* K. (pink arupo) native to the south of the country, and *Chionanthus virginicus* L. (white arupo), an introduced specie native to southeastern North America. The white arupo has some previous studies describing its secondary metabolites with antioxidant activity, while the pink arupo has not been investigated till now. In this study, the antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP methods), the phenolic content (Folin-Ciocalteu method), flavonoids (AlCl<sub>3</sub> method) and anthocyanins (pH differential method) present in ethanolic extracts of leaves, flowers and fruits of both species, were analyzed. The best antioxidant character was presented by the leaves of *Ch. pubescens* K. and *Ch. virginicus* L., as well as the highest total content of phenols (2845.55 mg GAE/100 g fw and 2386.17 mg GAE/100 g fw), and flavonoids (60.758 mg QE/g fw and 67.242 mg QE/g fw) respectively. The higher content of total anthocyanin was determined the pink arupo flowers with respect to the rest of the samples. Statistical analysis of the assays determined that there is no significant difference between each sample of the species of the genus *Chionanthus* evaluated, with the exception of anthocyanin content in flowers. It was determined that *Ch. pubescens* K. is a possible source of bioactive compounds with antioxidant properties, that could be exploited like *Ch. virginicus* L.

Key words: *Chionanthus*, arupo, antioxidant character, phenols, flavonoids, anthocyanins.

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

El género *Chionanthus* L. agrupa aproximadamente 140 especies, nativas en su mayoría de zonas tropicales a subtropicales en distintas partes de Asia, Australia, las Américas y África (Tar et al., 2018; Wadl et al., 2022). Al género lo representan 3 especies en la flora mesoamericana, mientras que para Sudamérica son 17 especies, de las cuales algunas han sido descritas en las últimas décadas (Córdova, 2018).

Estudios previos han mostrado que el árbol marginal o arupo blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo), miembro de la familia *Oleaceae*, es una especie propia del sureste de Norte América que presenta metabolitos secundarios con actividad antioxidante que lo han llevado a ser empleados en la medicina popular, en la producción de alimentos y cosméticos naturales (Gülçin et al., 2006). A menudo es empleado como paisaje leñoso o arbusto ornamental debido a estar exento de insectos y enfermedades, su rápido crecimiento y su exhibición floral (Wadl et al., 2022). La primera ocasión en la que se aislaron los metabolitos secundarios de esta especie se identificaron tres secoiridoides (oleuropeína, ligustrosido y angustifoliósido B) y cinco lignanos (phillyrin, pinosinol-4',4''-di-O-β-D-glucósido, pinosinol-4''-O-β-D-glucósido, phillyrin-2-O-β-D-glucósido, phillyrin-6-O-β-D-glucósido) en la corteza de la raíz, todos con actividad antioxidante (Boyer et al., 2006).

El arupo rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth), una especie originaria del norte de Perú y sur de Ecuador, es reconocida normalmente como una planta ornamental cultivada en diversos jardines de Ambato, Quito, Loja, Cuenca y posiblemente en otros sitios a lo largo de la Cordillera de los Andes. En 2017, Fernández & Cogollo tomaron registro de esta especie en el catálogo "Flora de Colombia" junto con *Chionanthus compactus* y *Chionanthus implicatus*, dos especies nativas del país vecino; sin embargo, como se menciona en la publicación, esta no cuenta con estudios previos sobre su naturaleza química y componentes bioactivos.

Los metabolitos secundarios de las plantas han sido descritos como antibióticos, antioxidantes, antifúngicos y antivirales, que juegan un rol esencial como mecanismos de defensa para las diversas especies vegetales ante factores bióticos y abióticos. Se ha demostrado que presentan un amplio número de efectos biológicos dependiendo del espécimen, estos estudios han proporcionado la base científica para catalogarlos como una fuente diversa de principios activos para medicamentos y valiosos químicos aplicables a la industria (Hussein et al., 2018).

Algunos de estos compuestos bioactivos presentan la capacidad de impedir la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y consecuentemente el estrés oxidativo a nivel celular, esta característica es denominada capacidad antioxidante (Augustyniak et al., 2010). El carácter antioxidante, producido por microorganismos, hongos, animales y en mayor frecuencia por plantas, tiene diversas aplicaciones en el área industrial al actuar como: colorantes (flavonoides, taninos condensados o antocianinas), agente conservante (mayoría de compuestos fenólicos tienen propiedades bactericidas), donante de características sensoriales (sabor, olor, textura, color) o agentes frente el estrés ambiental causado por la contaminación del aire (Pokorný, 2007).

Durante los últimos años, el análisis, extracción y uso de antioxidantes de origen natural se ha mostrado como un área de interés por su accesibilidad y potencial bioactivo frente a los antioxidantes de origen sintético. El uso de moléculas sintéticas antioxidantes se ha asociado con posible toxicidad y efectos secundarios (Caleja et al., 2017). Dentro de la industria alimenticia, la inestabilidad de los antioxidantes naturales ocasionó el uso de sus contrapartes artificiales en alimentos debido a su alta reactividad, mayor eficacia y eficiencia en conservación. Sin embargo, hoy en día existe presión de su reemplazo por compuestos naturales por ser ecológicos, por sus propiedades funcionales y creciente demanda de productos alimenticios que garanticen la seguridad de los consumidores (Uzombah, 2022).

*Ch. pubescens* Kunth es una especie vegetal poco abordada en el país dentro de los puntos mencionados, a diferencia de otras especies del género y principalmente de *Ch. virginicus* Linneo

que, si bien cuenta con un limitado número de publicaciones, se ha demostrado el contenido de compuestos bioactivos de interés que han sido empleados desde la antigüedad por los nativos americanos, hasta la actualidad por la medicina herbaria occidental (Penman et al., 2008).

### **Justificación del problema**

El ser humano desde sus inicios ha estado ligado al medio ambiente, muchas de sus necesidades y enfermedades han sido tratadas mediante las plantas a lo largo de los años (Hassan et al., 2020). Se calcula que existen cerca de 435 mil especies vegetales terrestres y que se describen dos mil más por año, sin embargo, muchas de estas aún con descripciones y estudios deficientes (Christenhusz & Byng, 2016; Corlett, 2016). La complejidad química de las diversas especies vegetales permite valorarlas como una rica fuente de principios activos y como un modelo para sintetizar numerosas moléculas con aplicaciones en la medicina, farmacéutica, agricultura, industria alimenticia y textil (Aleaga, 2014).

*Ch. pubescens* Kunth o arupo rosado es uno de los árboles ornamentales más tradicionales del Ecuador, reconocido debido al maravilloso color rosado que presentan sus flores durante los meses de julio-septiembre. Es una especie que presenta una alta tolerancia a la contaminación ambiental, lo cual le permite formar parte de avenidas, parques y jardines de las distintas ciudades de nuestro país (Peralta, 2017). Sin embargo, siendo una planta originaria de Ecuador, se ha limitado a un uso ornamental.

El tamizaje y cuantificación fitoquímico son las primeras etapas de la investigación fitoquímica para cualquier especie vegetativa, estas permiten determinar cualitativamente y cuantitativamente sus principales grupos químicos (fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides, esteroides, cumarinas, taninos) para posteriormente fraccionar los extractos y aislar los grupos de interés dependiendo de su principio activo y su tentativa aplicación (Balseca, 2017). Algunos de estos compuestos son antioxidantes que actúan como agentes de protección que reducen el estrés oxidativo que podría afectar las moléculas biológicas, esta característica ha ganado relevancia en su

identificación y aislamiento para ser suministrados como componentes alimenticios o productos farmacéuticos a humanos y animales (Gülçin et al., 2008; Iqbal et al., 2015).

Por este motivo se da la importancia a la evaluación metabólica del arupo rosado, debido a que esta especie podría ser una fuente importante de principios activos similar a otros miembros del género *Chionanthus* como lo es el árbol marginal (*Ch. virginicus* L.) que es empleado como colagogo, diurético tónico y plaguicida (Gülçin et al., 2007). Al pertenecer a la familia de las *Oleaceae*, misma donde se encuentra la hoja de Olivo (*Olea europaea*), planta de gran importancia económica en Europa, podría compartir sus propiedades energéticas, cardiovasculares, inmunológicas e incluso actividad antioxidante que explicarían su alta tolerancia a la contaminación, plagas y enfermedades (Žuntar et al., 2019).

## Objetivos del proyecto

### Objetivo general

Evaluar el contenido de metabolitos secundarios y carácter antioxidante en hojas, flores y frutos entre las especies de arupo rosado (*Chionanthus pubescens* K.) y blanco (*Chionanthus virginicus* L.) mediante métodos espectrofotométricos.

### Objetivo específico

- Recolectar muestras de hojas, flores y fruto de Arupo rosado (*Ch. pubescens* K.) y blanco (*Ch. virginicus* L.).
- Obtener los extractos etanólicos a partir de las muestras recolectadas.
- Cuantificar el contenido de metabolitos secundarios en las muestras de las dos especies mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, método colorimétrico del  $AlCl_3$ , y método CAT (Cantidad de antocianinas totales).
- Determinar el carácter antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos mediante el método DPPH, ABTS y FRAP.
- Comparar el carácter antioxidante y los metabolitos secundarios entre las dos especies del género *Chionanthus*.

### Hipótesis del proyecto

La concentración de metabolitos secundarios y el carácter antioxidante presente en hojas, flores y fruto de arupo rosado (*Ch. pubescens* K.) tiene una significancia estadísticamente mayor que en el arupo blanco (*Ch. virginicus* L.).

## Capítulo II: Marco referencial

### Género *Chionanthus*

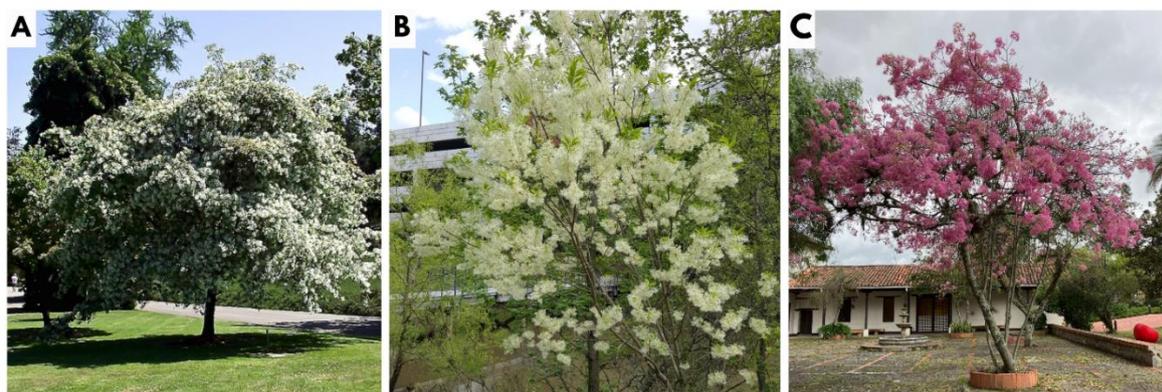
Es un género que pertenece a la familia de las Oleáceas, conformado por más de 140 especies. Tres especies son árboles y arbustos caducifolios templados, *Ch. pygmaeus* y *Ch. virginicus* del sureste norteamericano son un grupo distinto y el único linaje templado de América del Norte, *Ch. retusus* del centro y sureste de China y el resto de especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales (pantropicales) (Wadl et al., 2022). En la flora mesoamericana es representado por tres especies, mientras que en Sudamérica se reconocen otras diecisiete (Fernández & Cogollo, 2017).

Los especímenes tropicales presentan hojas perennes, mientras que las especies de zonas templadas muestran hojas caducas (Wadl et al., 2022). De forma general, se caracterizan por ser arbustos o árboles pequeños que alcanzan entre los 3 a 25 metros de altura, por tener hojas opuestas y simples, fruta en drupa y flores dispuestas en racimos de colores rosa, blanco, amarillo o teñido (Fernández & Cogollo, 2017).

En el Ecuador, este género está representado por tres especies: *Ch. colonchensis*, *Ch. implicatus* L. y *Ch. pubescens* K. Estos tres miembros de la familia *Oleaceae* se distribuyen en las cuatro regiones naturales. En la zona costera, *Ch. colonchensis* es endémica del occidente del país, mientras que, *Ch. implicatus* L. se encuentra en la Amazonía. *Ch. pubescens* K. es originaria de la región Andina, aunque también se ha reportado en la provincia de Puerto Baquerizo Moreno (región Insular) (Romero et al., 2021).

**Figura 1**

Miembros del género *Chionanthus*: A) *Ch. retusus*, B) *Ch. virginicus* y C) *Ch. pubescens*



*Nota:* Adaptado de *Chionanthus retusus* (*Chinese Fringetree*, *Chinese Fringe Tree*) [North Carolina Extension], por Walton, 2022, Gardener Plant Toolbox; *White Fringetree* (*Chionanthus virginicus*), por Owens, 2018, iNaturalist United Kingdom; *Chionanthus pubescens*, de Paz, 2022, iNaturalist United Kingdom.

### Clasificación taxonómica

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica del arupo rosado (Chionanthus pubescens Kunth)*

| Categoría         | Taxón                              |
|-------------------|------------------------------------|
| Reino             | Plantae                            |
| División          | Madnoliophyta (planta con flores)  |
| Clase             | Magnoliopsida (dicotiledónea)      |
| Orden             | Lamiales                           |
| Familia           | <i>Oleaceae</i>                    |
| Nombre Científico | <i>Chionanthus pubescens</i> Kunth |
| Nombres Comunes   | Arupo (Ecuador), Chuquil (Perú)    |

*Nota:* Adaptado de *El arupo (Chionanthus pubescens Kunth)*, árbol ornamental con potencial de uso en Ecuador, por Peralta, 2017, IDEAZ.

**Tabla 2**

*Clasificación taxonómica del arupo blanco (Chionanthus Virginicus Linneo)*

| <b>Categoría</b>         | <b>Taxón</b>                         |
|--------------------------|--------------------------------------|
| <b>Reino</b>             | Plantae                              |
| <b>División</b>          | Madnoliophyta (planta con flores)    |
| <b>Clase</b>             | Magnoliopsida (dicotiledónea)        |
| <b>Orden</b>             | Lamiales                             |
| <b>Familia</b>           | <i>Oleaceae</i>                      |
| <b>Nombre Científico</b> | <i>Chionanthus virginicus</i> Linneo |
| <b>Nombres Comunes</b>   | Fringe tree, árbol marginal          |

*Nota:* Adaptado de *El arupo (Chionanthus pubescens Kunth), árbol ornamental con potencial de uso en Ecuador*, por Peralta, 2017, IDEAZ.

### **Descripción botánica**

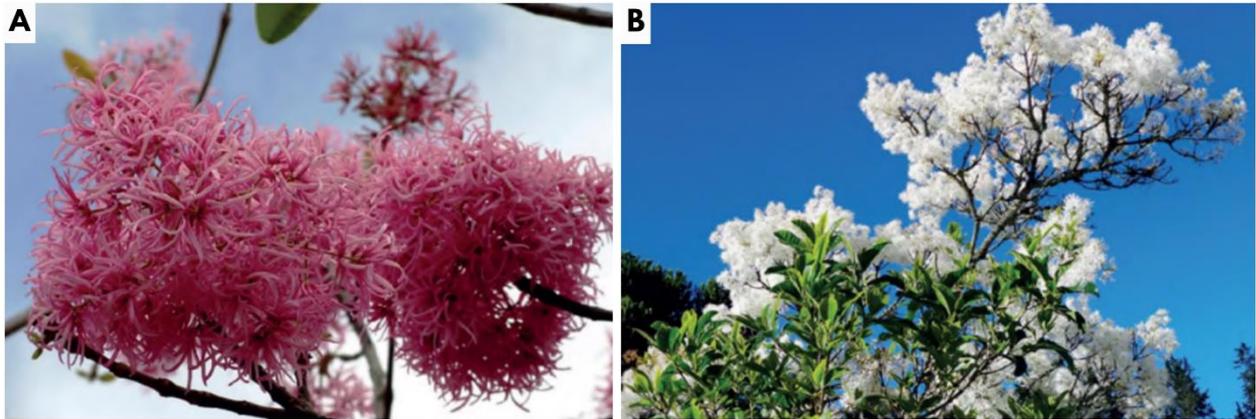
Su nombre proviene del griego *Chionanthus* que significa “flores de nieve” debido a los característicos colores que poseen las inflorescencias de algunos de sus miembros (blanco, tonos desde rosado claro hasta morado); para el arupo rosado, *pubescens* significa “peludo” por las estructuras similares a vello que cubren sus hojas (Peralta, 2017).

*Ch. pubescens* Kunth, al igual que *Ch. virginicus* Linneo, son árboles caducifolios miembros de la familia de las Oleáceas que alcanza de 6 hasta 8 metros de altura, poseen raíces pivotantes muy ramificadas y un tronco recubierto por lenticelas con un grosor que varía entre los 40 a 50 cm de diámetro que ramifica cerca del suelo de forma heterogénea (Idrobo, 2003).

Cuenta con hojas simples, ovadas/oblongas, pecioladas y opuestas, con una superficie glabra en el as y pubescente en el envés; sus hojas maduras miden entre 3-17 cm de largo y 4-7 cm en ancho, muestran un color verde claro el cuál se oscurece a medida que envejecen (Quishpe, 2011).

**Figura 2**

Flores rosadas y blancas dispuestas en panículas de A) *Ch. pubescens* y B) *Ch. virginicus*



Nota: Adaptado de *El arupo (Chionanthus pubescens Kunth), árbol ornamental con potencial de uso en Ecuador*, por Peralta, 2017, IDEAZ.

El arupo es una especie monoica, hermafrodita que presenta una floración anual desde sus primeros 8 a 10 años de vida, este acontecimiento es aleatorio con respecto a cada rama (parte baja, media o terminal primero) e inicia dependiendo de las condiciones de su ubicación entre los meses de abril y mayo, manteniéndose florecido cerca de 40 días (Romero et al., 2021). En los valles de Quito esta época inicia en el mes de abril, mientras que en Imbabura entre mayo-septiembre. Las flores se disponen en panículas (racimo de racimos), oscilan entre los 6 a 9 racimos por rama, 40 a 283 flores en un racimo de racimos y con pétalos de color rosado para *Ch. pubescens* y blancos para *Ch. virginicus*, con un largo promedio de 3 cm, y con una diferencia en sus anteras, de dos y dos a cuatro (Peralta, 2017).

Su fruto es conocido como drupa, fruto simple de mesocarpio carnoso que envuelve un endocarpio leñoso, de ápice puntiagudo y una sola semilla. Tiernos son de color verdes y van adquiriendo manchas moradas que van oscureciendo completamente la superficie al madurar, llegando a medir cerca de 2 cm de largo y 1,2 cm de ancho (1,8 cm de largo en el caso del arupo blanco), con una consistencia suave y sabor amargo (Peralta, 2017; Romero et al., 2021).

### **Origen y distribución**

El arupo rosado es originario de la región andina, precisamente del sur de Ecuador y norte de Perú. Incluso es encontrado en algunas regiones ubicadas al sur de Colombia (Fernández & Cogollo, 2017). En Ecuador crece naturalmente en remanentes boscosos de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe; las especies proveniente de estos valles al sur del país han sido distribuidos a todas las provincias que conforman la sierra ecuatoriana, en alturas que van desde los 1800 a 3050 msnm (Córdova, 2018). En las ciudades de Cuenca, Ambato, Quito y sus valles cercanos es encontrado en jardines de hogares, avenidas/veredas, parques públicos y privados (Idrobo, 2003). Por otro lado, en Perú, el Chuquil crece en las laderas xéricas (secas) junto con flora caducifolia y arbustos perennifolios de los valles interandinos.

Por otra parte, el arupo blanco se encuentra presente en Ecuador como una especie introducida que ha logrado adaptarse a las condiciones ecológicas y fisiográficas de la región andina. Conocido como arupo de Virginia, es nativo de los Estados Unidos América, extendiéndose desde el sur de Pensilvania y Nueva Jersey hasta el sur de Florida y el oeste de Texas (Romero et al., 2021).

### **Arupos en Ecuador**

El arupo rosado, en su lugar de origen es considerado un árbol de alto valor debido a la dureza de su madera color blanquecina. Es empleado en la construcción de rodillos para molinos caseros y como mango de herramientas, esto ocasiono en una época que sea considerado una especie en riesgo, sin embargo, por su valor ornamental es conservado en parques de Ambato y Quito (Idrobo, 2003).

Dentro del Informe País respecto a la Situación de los recursos Genéticos Forestales en Ecuador emitido en el 2012 indica que la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) conserva 2 accesiones a Arupo (*Chionanthus pubescens* Kunth) en su banco de germoplasma. Por otra parte, también se reporta que el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CADET) de la Universidad Central

del Ecuador (UCE) realizó un rescate de embriones y el Municipio de Quito se encargó del cultivo de tejidos durante ese año (Checa & Grijalva, 2012).

Con el objetivo de disponer de evidencias fotográficas del arupo rosado en la sierra ecuatoriana, fueron plantados ejemplares en la Plaza Grande de Quito, frente al Palacio de Carondelet, donde anualmente es promocionado en medios impresos durante su florecimiento en los meses de mayo y agosto (Peralta, 2017).

Normalmente, el Arupo de color rosado es el más visualizado en el país, sin embargo, en la ciudad de Quito también se puede encontrar una variante, el arupo de flores blancas, especie cercana de Norteamérica.

### **Metabolitos secundarios**

La fitoquímica es el estudio de las sustancias químicas producidas por las plantas, principalmente sus metabolitos secundarios, para la comprensión de sus composiciones estructurales, vías biosintéticas, funciones, mecanismos de acción en el sistema vivo, las técnicas para su aislamiento y cuantificación. Ha sido una disciplina científica de importancia en el descubrimiento de nuevos productos naturales de valor comercial e industrial (Egbuna et al., 2018).

Los metabolitos secundarios de plantas (PSM) son sustancias producidas por las plantas que no participan directamente en el crecimiento o desarrollo del individuo a diferencia de los metabolitos primarios (carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas, clorofilas), pero que son utilizados como una ventaja para responder a estímulos externos como factores ambientales, depredadores, microorganismos y el ser humano (Pang et al., 2021). Los metabolitos secundarios están ligadas al grupo taxonómico, en ocasiones dependen de cada especie y cumplen funciones específicas como pesticidas naturales, antioxidantes, señales químicas, atractores o repelentes de animales e insectos, entre otras (Bruneton, 2001).

Un amplia variedad de estos compuestos han sido aislados y utilizados por el ser humano en la industria para la elaboración de medicamentos, conservantes, pigmentos, resinas, pesticidas, alimentos, etc. Algunos ejemplos distinguidos son los flavonoides, saponinas y glucósidos cianógenos, fenoles y glucósidos fenólicos, estilbenos, compuestos nitrogenados (alcaloides, aminas, betalainas), taninos, terpenoides y algunos otros metabolitos endógenos (Iqbal et al., 2015).

### ***Metabolitos secundarios en el género Chionanthus***

Dentro del género *Chionanthus*, son limitados los estudios respecto a la composición fitoquímica de sus integrantes.

En el caso del fringetree chino (*Chionanthus retusus*), integrante de la familia *Oleaceae*, es un árbol nativo de Corea, China, Taiwán y Japón. Dentro de sus características alcanza alturas entre 20-25 m., posee hojas caducas y ovaladas. Comúnmente es empleado como antipirético (regulador de fiebre), en el tratamiento de parálisis y diarrea, debido a la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, lignanos, esteroides y terpenoides (Lee et al., 2019).

Dentro de la investigación de Lee et al. (2019), a *Ch. retusus* se la ha evaluado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad como la neurodisminución por la actividad neuroprotectora que presenta gracias a su contenido de flavonoides y fenoles, los cuales suprimen la neuroinflamación, protegen las neuronas como antioxidantes, promueven la memoria y la función cognitiva, siendo un potencial terapéutico en este tipo de enfermedades. Estos estudios se realizaron a partir de sus flores, donde reportaron que el 10,7% de los flavonoides totales se encontraban en este órgano. Los flavonoides identificados fueron: quercentina, kaempferol, astragalina, nicotiflorina, luteolina, luteolina 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, isorhoifolina, taxifolina, aromadendrina, aromadendrina 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, taxifolina 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y yeriodictyol 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido.

Otro miembro de este género que ha sido investigado de forma cualitativa es la geratiya (*Chionanthus zeylanicus* L.), un árbol pequeño común en bosques caducifolios secos, endémico del

sur de Asia, que alcanza alturas de 2-5 metros. Presenta hojas ovado-ovadas, obtusamente agudas, de base cuneada y color verde glauco. Sus flores pequeñas de color blanco, ligeramente fragantes y dispuestas en panículas axilares, su fruto son drupas ovoide oblongos de color marrón violáceo. Respecto a sus metabolitos, se ha aislado a partir de su tallo: flavonoides, esteroides, terpenoides, taninos, glucósidos, alcaloides reductores de azúcares, fenoles, quinonas y lignina, metabolitos responsables de su actividad antioxidante (Venkateswara et al., 2013).

### **Capacidad antioxidante**

Las condiciones desfavorables en las plantas como la temperatura extrema, metales pesados, sequía, alta salinidad y deficiencia de nutrientes, son los causantes de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Barua et al., 2014). Las ROS, también denominados radicales libres (RL), son especies químicas con uno o más electrones desapareados en la capa de valencia, se forman por la escisión homolítica de enlaces covalentes, comúnmente entre dos átomos de electronegatividad similar (San Miguel & Martin, 2009).

En química orgánica, la formación de RL ocurre en el enlace O-O (oxígeno-oxígeno) en especies de peróxido o en el enlace O-N (oxígeno-nitrógeno). Dentro de los organismos vivos, se producen como subproducto del metabolismo del oxígeno; al ser muy inestables y reactivas, tienden a capturar un electrón de otras moléculas para alcanzar una configuración electrónica estable, ocasionando un desequilibrio entre estos RL y los antioxidantes, también denominado el estrés oxidativo (Litescu et al., 2010). La reacción en cadena afecta los enlaces de las proteínas de los tejidos, los carbohidratos, los fosfolípidos de la membrana celular y el ADN, ocasionando la muerte celular (San Miguel & Martin, 2009).

Frente esta amenaza, las células cuentan con un complejo sistema antioxidante con elementos enzimáticos y no enzimáticos, este último involucra moléculas con distintos mecanismos de acción como: inhibición enzimática, quelación de oligoelementos implicados en producción de RL, captación de ROS y activación o aumento de la protección mediante otras defensas. Los metabolitos

secundarios de las plantas se encuentran dentro del sistema antioxidante no enzimático (Chaves et al., 2020).

Un antioxidante es cualquier sustancia o molécula que, en pequeñas concentraciones en comparación con un sustrato oxidante, son capaces de retrasar e inhibir significativamente los procesos de oxidación ocasionados por el oxígeno molecular o ROS (Pisoschi & Negulescu, 2012). A partir de este surge el término capacidad antioxidante, definido como el potencial químico que tiene una solución antioxidante (mezcla de compuestos) para funcionar como un aceptor de electrones y dificultar o inhibir la oxidación de otras moléculas por RL (Litescu et al., 2010).

Los compuestos con carácter antioxidante son naturalmente encontrados en las plantas, en moléculas que presentan estructuras cíclicas y fenólicas que se caracterizan por ser susceptibles a la oxidación. Existe un interés creciente por estos, particularmente los destinados al tratamiento de enfermedades degenerativas, envejecimiento, al deterioro de grasas y constituyentes alimentarios (López, 2007; Pisoschi & Negulescu, 2012).

### ***Mecanismo operativo de los antioxidantes***

Los radicales libres tienen la capacidad de donar o aceptar un electrón de otras moléculas. Al romper la cadena, los RL liberan o extraen electrones para formar un segundo radical que continua el proceso con una tercera molécula y así sucesivamente dando como resultado productos inestables que prolongan los procesos de reactividad y oxidación (Uzombah, 2022). Existen múltiples fuentes de radicales libres y oxidantes, algunos ejemplos son  $O_2$ ,  $O_2^{*-}$ ,  $HO^*$ ,  $NO^*$ ,  $ONOO^-$ ,  $HOCl$ ,  $RO(O)^*$ ,  $LO(O)^*$ ; todos cuenta con propiedades químicas y físicas distintas (Prior et al., 2005). Las sustancias objetivo de estos RL en los organismos vivos comprenden al oxígeno, ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos, colesterol y ácidos nucleicos.

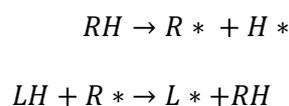
Para la neutralización de los radicales libres se requiere proporcionar electrones para estabilizarlos y/o inhibir su reactividad. Los antioxidantes donan fácilmente electrones (hidrógeno) a los RL para estabilizarlos, de esta forma se evita la generación de especies reactivas, la

descomposición de peróxidos lipídicos, la formación de peróxidos, se rompe la cadena oxidativa y/o reduce las concentraciones de oxígeno molecular localizado (Atta et al., 2017).

El mecanismo de acción de los antioxidantes consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Atta et al., 2017; Uzombah, 2022).

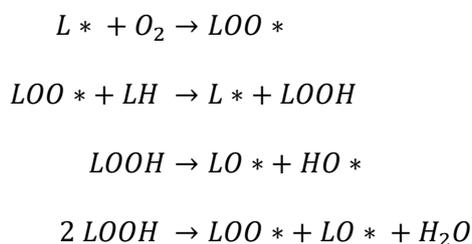
### **Iniciación**

En una etapa normal de iniciación, una molécula de sustrato o sistema  $LH$  se produce tras la abstracción del átomo de hidrógeno por parte de un radical oxidante iniciador ( $R^*$ ), generando un radical libre para iniciar la cadena de oxidación.



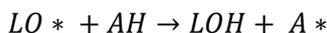
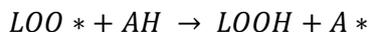
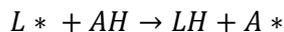
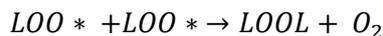
### **Propagación**

La propagación de la reacción en cadena se da por la capacidad de los radicales libres para reaccionar con el oxígeno, formando peróxidos ( $LOOL$ ) y radicales peroxilo ( $LOO^*$ ). Los radicales peroxilo son los transportadores de cadena, pueden oxidar más el sustrato, produciendo hidroperóxidos ( $LOOH$ ) y al mismo tiempo descomponerse en otros compuestos como alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos y radicales como el alcoxilo ( $LO^*$ ).



### **Terminación**

La etapa terminal puede efectuarse mediante dos casos, cuando dos radicales se combinan para formar una especie estabilizada o mediante un antioxidante ( $AH$ ) que dona un átomo de hidrógeno, finalizando la reacción en cadena.



Los antioxidantes primarios, en cantidades mínimas, se encargan de retrasar o inhibir la etapa de iniciación y el paso a la propagación, mientras que los antioxidantes secundarios o preventivos retardan la tasa de oxidación mediante la eliminación del sustrato o del oxígeno singulete.

#### ***Métodos para la determinación del carácter antioxidante***

Los métodos para cuantificar la capacidad antioxidante se clasifican según el mecanismo de acción mediante el cual los compuestos detienen las reacciones de ruptura de cadena, de esta forma se dividen en dos grupos: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de un solo electrón (SET) (Chaves et al., 2020). Dentro de estos grupos, los diferentes métodos varían según el sustrato empleado, el agente oxidante, la técnica instrumental, la medida del punto final y la interacción de la muestra con el medio. Entre los métodos más empleados se encuentra el ensayo de DPPH, ABTS, FRAP, TRAP, ensayo basado en crocina y el basado en luminol (Fernández et al., 2006).

Los métodos basados en HAT miden la capacidad clásica de un antioxidante para inhibir los radicales libres mediante la donación de hidrógeno (AH) y dando como resultado un compuesto más estable. Dentro de este grupo se encuentran los métodos TRAP, TOSC, ORAC y blanqueo de crocina (Litescu et al., 2010).

Los basados en SET detectan la capacidad de un antioxidante potencial para transferir un electrón para reducir cualquier compuesto (incluye radicales, metales y carbonilos). A diferencia de

los métodos HAT, este grupo depende del pH, son reacciones lentas, basan los cálculos de la capacidad antioxidante respecto a la disminución porcentual del producto en lugar de la cinética y sus resultados tiene variabilidad ante la presencia de contaminantes y elementos traza. Los métodos pertenecientes a este grupo son: DPPH, FRAP, ABTS, CUPRAC y RP (Prior et al., 2005).

**Tabla 3**

*Métodos analíticos para la evaluación de la capacidad antioxidante por categorías*

| Ensayo                | Principio del método  | Determinación del producto final            |
|-----------------------|---|---|
| <b>Espectrometría</b> |   |   |
| DPPH                  | Reacción antioxidante con un radical orgánico   | Colorimetría                                |
| ABTS                  | Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico   | Colorimetría                                |
| FRAP                  | Reacción antioxidante con un complejo Fe(III)   | Colorimetría                                |
| PFRAP                 | Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y luego reacción de ferrocianuro de potasio con Fe <sup>3+</sup> | Colorimetría                                |
| CUPRAC                | Reducción de Cu (II) a Cu(I) por antioxidantes  | Colorimetría                                |
| ORAC                  | Reacción antioxidante con radicales peroxilo inducido por AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propano)                          | Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína |

| <b>Ensayo</b> | <b>Principio del método</b>  | <b>Determinación del producto final</b>                       |
|---------------|--|---|
| HORAC         | Capacidad antioxidante para apagar los radicales OH producidos por un sistema tipo Fenton basado en Co(II)                 | Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína                   |
| TRAP          | Capacidad antioxidante para eliminar radicales derivados del luminol producidos a partir de AAPH                           | Apagado de quimioluminiscencia                                |
| Fluorimetría  | Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética de una longitud de onda diferente. | Grabación de espectros de excitación/emisión de fluorescencia |

#### **Cromatografía**

|   |   |   |
|---|---|---|
| Cromatografía de gases                          | Separación de compuestos mediante una fase estacionaria líquida y una fase móvil gaseosa  | Ionización de llama o detección de conductividad térmica                            |
| Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | Separación de compuestos mediante una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida con distintas polaridades, a alto caudal y presión de la fase móvil | Detección UV-VIS, fluorescencia, espectrometría de masas o detección electroquímica |

*Nota:* Adaptado de *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review*, por Pisoschi & Negulescu, 2012, *Biochemistry & Analytical Biochemistry*.

#### **Metabolitos con capacidad antioxidante**

Los fitoderivados más empleados en la industria son los que se sintetizan a partir del hidroxibenceno (fenol), conocidos como polifenoles o compuestos fenólicos, principalmente por su

remarcada capacidad de captación de radicales libres y su abundancia en el reino vegetal (Espadero, 2018).

El efecto de los compuestos fenólicos se relaciona con su estructura química y su capacidad para deslocalizar electrones sobre el anillo aromático, al reaccionar con un radical libre, el electrón capturado es deslocalizado y estabilizado por el efecto de resonancia del núcleo aromático, evitando las reacciones en cadena de los radicales libres (Litescu et al., 2010). Estos compuestos presentan gran diversidad estructural, lo que les atribuye una amplia clasificación según su complejidad y grado de solubilidad. De forma general se clasifican en flavonoides y no flavonoides (Swallah et al., 2020).

Los flavonoides son el grupo de mayor investigación por sus supuestas cualidades promotoras de la salud. Se caracterizan por su actividad antioxidante atribuida a su capacidad de secuestrar radicales libres y propiedades quelantes de hierro. Dentro de este grupo se encuentran las flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, chalconas, antocianidinas, entre otras. Los no flavonoides son compuestos conformados por un grupo carboxílico y un anillo fenólico, comúnmente encontrados en frutas como ésteres; este grupo comprenden a los polifenoles volátiles, lignanos, estilbenos, cumarinas, ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos (Valencia et al., 2016).

Dentro de los compuestos fenólicos también se encuentran considerados los taninos, no obstante, en concentraciones altas tienden a reducir la adsorción de nutrientes en los organismos, tales como el hierro o las proteínas (Iser et al., 2020).

### Capítulo III: Metodología

#### Obtención del material vegetal

Se recolectó aproximadamente 10 g de muestras (hojas, flores y frutos) de ambas especies de arupo (*Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L.) encontradas dentro de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicada en Sangolquí, cantón Rumiñahui, en la provincia de Pichincha. Las muestras fueron trasladadas en un cooler hasta los laboratorios del CICTE.

#### Tratamiento de muestras

Se seleccionaron de las hojas, flores y frutos recolectados los que se encontraban en mejores condiciones (completas y sin manchas). Se procuró que las muestras se encuentren en estado maduro, siendo las hojas de color verde oscuro, un tono morado oscuro en los frutos y las flores de colores rosado o blanco dependiendo de la especie. Las distintas muestras se lavaron utilizando agua destilada previo a su extracción.

#### Extracción de principios activos

Para la extracción se adaptó el método descrito por Murugan & Parimelazhagan (2014), utilizando las muestras vegetales frescas.

Los extractos se obtuvieron macerando 1 g muestra junto con 10 mL de solvente con ayuda de un mortero, en este caso se empleó etanol (96%). El contenido junto con el material pulverizado obtenido de las distintas muestras se colocó en tubos Falcon de 15 mL y se dejaron reposar los extractos en refrigeración (5°C) durante 72 h. Para las posteriores evaluaciones se realizó dilución 1:4 del extracto con el solvente (etanol 96%), a excepción de la determinación de fenoles totales para la cual se realizó una dilución 1:8.

#### Determinación del carácter antioxidante por el método DPPH

Para este método se adaptó el protocolo de Suarsana et al. (2018). Se preparó una solución stock a una concentración 0,15 mM de DPPH empleando como solvente etanol al 96%. A

continuación, se preparó el reactivo diluyéndolo con el mismo solvente hasta alcanzar una absorbancia de  $0,7 \pm 0,05$  y leyéndola a una longitud de onda de 517 nm.

Para el ensayo, se añadió 2,9 mL del reactivo en cada tubo de ensayo junto con 0,1 mL de cada muestra obtenida (extractos etanólicos) y sus respectivas repeticiones. Los tubos se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y se leyeron su absorbancia a 517 nm utilizando el espectrofotómetro. El blanco se preparó utilizando etanol en lugar de la muestra.

La capacidad antioxidante se determinó respecto al porcentaje de inhibición del radical DPPH empleando la ecuación 1. Mediante la construcción de una curva de calibración con Trolox se determinaron los resultados y expresaron en unidades de  $\mu\text{mol Trolox/g fw}$  (equivalente de Trolox/g de muestra fresca).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} * 100 \quad (1)$$

#### **Determinación del carácter antioxidante por el método ABTS**

Para su aplicación se modificó la metodología utilizada por Murugan & Parimelazhagan (2014). Para la preparación de la solución madre de radicales catiónicos  $\text{ABTS}^{*+}$ , se mezcló persulfato de potasio (2,45 mM en  $\text{H}_2\text{O}$ ) con sol. de ABTS (7 mM en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y en proporción 1:1. La solución se dejó reaccionar de 12 a 48 horas; pasado este tiempo se diluyó con etanol absoluto hasta obtener un valor de  $0,7 \pm 0,02$  leyéndola a 754 nm con ayuda del espectrofotómetro.

Para determinar la capacidad de inhibición de radicales se dejó reaccionar 20  $\mu\text{L}$  de las muestras con 2 mL de sol. ABTS diluida en tubos de ensayo. Las mezclas se dejaron reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente durante 7 minutos y se leyeron a 734 nm. El blanco se preparó utilizando el solvente de extracción (etanol) en lugar de la muestra. Los resultados se determinaron mediante la construcción de una curva patrón utilizando Trolox y se expresaron como  $\mu\text{mol Trolox/g fw}$ .

### **Determinación del carácter antioxidante por el método FRAP**

Para la determinación de la capacidad antioxidante reductora de iones férrico se adaptó el método de Cacique et al. (2020).

La solución de trabajo FRAP se preparó mezclando 10 mL de TPTZ en ácido clorhídrico (40 mM) con 100 mL tampón acetato (300 mM) a un pH 3,6 y 10 mL de  $\text{FeCl}_3$  en agua (20 mM). Se obtuvo una solución homogenizada con proporción 1:10:1 y se dejó reposar a 37°C durante 3 horas.

La reacción se realizó en tubos de ensayo pipeteando 0,1 mL de las muestras con 3 mL de la solución de trabajo FRAP y 0,3 mL de agua destilada, la mezcla se dejó reposar durante 45 minutos a una temperatura de 37°C. Los análisis se realizaron mediante el espectrofotómetro leyendo las mezclas homogenizadas a 593 nm. El blanco se preparó utilizando etanol en lugar de la muestra.

La curva de calibración se construyó trazando las absorbancias de concentraciones variables de sulfato férrico ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), entre 0 - 5 mM, y se leyeron a una longitud de onda de 593 nm. La potencia reductora de las muestras se expresó como  $\text{mg Fe}_2\text{SO}_4/100 \text{ g fw}$ .

### **Determinación del contenido de fenoles totales (TPC)**

Se utilizó el método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Sun et al. (2015) con ligeras modificaciones.

Se añadió 0,4 mL de los extractos alcohólicos a los tubos de ensayo junto con 0,4 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (1 N) y 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Después de dejar reposar a la mezcla por 6 minutos, se agregaron 0,4 mL de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20% y 0,8 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Los tubos con la solución resultante se incubaron por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se leyeron sus absorbancias a 765 nm utilizando el espectrofotómetro.

Para la construcción de la curva de calibración se utilizó ac. gálico y los valores resultantes se expresaron como equivalentes de ac. gálico ( $\text{mg GAE/g muestra}$ ).

### Determinación del contenido de flavonoides totales (TFC)

Se adaptó el método colorimétrico con cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) descrito por Ammar et al. (2022).

En tubos de ensayo, con ayuda de la micropipeta, se colocó 1 mL del extracto etanólico junto con 1,5 mL de solvente de extracción (etanol), 0,1 mL de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) a concentración 1 M, 0,1 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 10% (no usado en la preparación del blanco) y 2,3 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. La mezcla en el tubo de ensayo se incubó por 35 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se leyó su absorbancia a 435 nm en el espectrofotómetro.

La curva de calibración se construyó utilizando quercentina como estándar de referencia a una concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con etanol. El contenido total de flavonoides se expresó como miligramos equivalentes de quercentina (mg QE/g muestra).

### Determinación del contenido de antocianinas totales (CAT)

Se empleó el método de pH diferencial adaptado por Barragán *et al.* (2021).

El método consistió en pesar 5 g de las muestras de flores y frutos, colocándolos en tubos Falcon de 30 mL, dando como resultado 2 tubos por muestra y especie. Se pipeteó 5 mL de cada sistema buffer para cada tubo por muestra y especie: KCl o cloruro de potasio (0,025 M) a pH 1,0 y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  o acetato de sodio (0,4 M) a pH 4,5. Pasado unos minutos se filtró el contenido en tubos de ensayo utilizando papel filtro y se leyó cada tubo a longitudes de 520 y 700 nm.

El cambio de absorbancia ( $A_c$ ) se obtuvo empleando la ecuación 2 y el cálculo del contenido total de antocianinas monoméricas (CAT) se calculó mediante la ecuación 3, donde PM representó la masa molecular para la cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol),  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar para la cianidina-3-glucósido (26900 L/mol cm), l el camino óptico de celda (1 cm) y FD el factor de dilución. Los resultados se expresaron en mg cianidina-3-glucósido/L extracto.

$$A_c = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad (2)$$

$$\text{CAT} = \frac{A_c \cdot \text{PM} \cdot \text{FD}}{\varepsilon \cdot l} * 1000 \quad (3)$$

### **Determinación del peso seco**

Se pesaron aproximadamente 1,0 g por cada muestra con ayuda de una balanza analítica, con excepción de los frutos donde se procuró tomar valores cercanos entre sí. Las muestras se introdujeron en sobres de papel periódico, se sellaron para evitar variar el contenido de cada sobre y se colocaron bajo objetos con un considerable peso para promover su secado durante 5 días. Para cada muestra se realizó el ensayo por triplicado y sus valores se expresaron en % de humedad.

### **Análisis estadístico**

#### ***Factores de estudio y unidad experimental***

Los factores de estudio en la evaluación de la composición fitoquímica fueron las dos especies del género *Chionantus* y los tres distintos órganos vegetales (muestras): hoja, flores y fruto. En el caso del carácter antioxidante, los factores fueron los métodos utilizados (DPPH, ABTS, FRAP) y el tipo de muestra utilizada por cada especie.

La unidad experimental fueron las hojas, flores y frutos, en estado maduro, de las dos especies de arupo.

#### ***Tratamientos***

Para el análisis estadístico del contenido de metabolitos secundarios se realizó un diseño factorial mixto 2x3 para cada método aplicado: contenido de fenoles totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y contenido de antocianinas totales (CAT). Se estableció un diseño para las dos especies de arupo (a=2) y la determinación del contenido de los compuestos en los tres tipos de muestras (b=3). Los ensayos se realizaron con cinco réplicas (n=5) como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4**

*Diseño experimental factorial para la determinación del contenido de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides y antocianinas totales*

| Especie                  | Tipo de muestra |      |       |
|--------------------------|-----------------|------|-------|
|                          | Hoja            | Flor | Fruto |
| <i>Ch. pubescens</i> K.  | 5               | 5    | 5     |
| <i>Ch. virginicus</i> L. | 5               | 5    | 5     |

Para la evaluación del carácter antioxidante, se realizó un diseño factorial mixto 3<sup>2</sup> debido a los tres métodos utilizados (a=3) para determinar el porcentaje de inhibición por cada tipo de muestra (b=3) de las dos especies de arupo, cada una con cinco réplicas (n=5) como se indica en la tabla 5 y 6.

**Tabla 5**

*Diseño experimental factorial del Arupo Rosado (Ch. pubescens K.) para la determinación del carácter antioxidante*

| Métodos | <i>Muestra de Chionanthus pubescens</i> K. |      |       |
|---------|--|------|-------|
|         | Hoja                                       | Flor | Fruto |
| DPPH    | 5  | 5    | 5     |
| ABTS    | 5  | 5    | 5     |
| FRAP    | 5  | 5    | 5     |

**Tabla 6**

*Diseño experimental factorial del Arupo blanco (Ch. virginicus L.) para la determinación del carácter antioxidante*

| Métodos | <i>Muestra de Chionanthus virginicus L.</i> |      |       |
|---------|---|------|-------|
|         | Hoja  | Flor | Fruto |
| DPPH    | 5   | 5    | 5     |
| ABTS    | 5   | 5    | 5     |
| FRAP    | 5   | 5    | 5     |

Los experimentos manejaron un diseño completamente al azar y se estudió el análisis de varianza de cada uno. La comparación entre las medias se realizó con la prueba de Kruskal Wallis y un  $p_{\text{valor}} < 0,05$ .

#### **Esquema de análisis de varianza**

El esquema empleado para el análisis de varianza de los diseños factoriales para la determinación de los compuestos fitoquímicos y la evaluación del carácter antioxidante de cada una de las especies de arupo se presenta en la tabla 7.

**Tabla 7**

*Esquema del ANOVA para el diseño factorial mixto 2x3 y 3<sup>2</sup> propuesto*

| Fuente de variabilidad | Grados de libertad      | Compuestos   | Carácter antioxidante |
|------------------------|-------------------------|--------------|-----------------------|
|                        |                         | fitoquímicos |                       |
| Factor a               | $a - 1$                 | 1            | 2                     |
| Factor b               | $b - 1$                 | 2            | 2                     |
| Efecto ab              | $(a - 1) \cdot (b - 1)$ | 2            | 4                     |

| <b>Fuente de variabilidad</b> | <b>Grados de libertad</b> | <b>Compuestos<br/>fitoquímicos</b> | <b>Carácter antioxidante</b> |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| <b>Error (e)</b>              | $a \cdot b \cdot (n - 1)$ | 24                                 | 36                           |
| <b>Total</b>                  | $a \cdot b \cdot n - 1$   | 29                                 | 44                           |

Adicionalmente se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para el estudio de correlación entre los datos obtenidos de la evaluación de los compuestos metabólicos y el carácter antioxidante.

## Capítulo IV: Resultados

### Obtención y tratamiento del material vegetal

Se recolectaron aproximadamente 10,0 g de los distintos órganos vegetales pertenecientes a cada especie en evaluación. Las distintas muestras se las trabajó bajo la nomenclatura mostrada en la tabla 8.

**Tabla 8**

*Nomenclatura de las muestras evaluadas de las dos especies del género Chionanthus*

| Especie   | Muestra                | Código |
|---|------------------------|--------|
| Arupo Rosado/ <i>Chionanthus pubescens</i> K.<br>(AR) | Hoja en estado maduro  | AHR    |
|   | Flores rosadas         | AHF    |
|   | Fruto en estado maduro | AHFr   |
| Arupo Blanco/ <i>Chionanthus pubescens</i> K.<br>(AB) | Hoja en estado maduro  | ABH    |
|   | Flores blancas         | ABF    |
|   | Fruto en estado maduro | ABFr   |

**Figura 3**

*Muestras recolectadas de arupo rosado (Ch. pubescens K.) y arupo blanco (Ch. virginicus L.)*



Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

Cada muestra recolectada (figura 3) fue lavada con agua destilada.

### Obtención de los extractos etanólicos

Se obtuvieron extractos con acentuados colores (verde oscuro, amarillo ocre y morado) dependiendo del tipo muestras (hojas, flores y frutos, respectivamente) al trasvasar el contenido líquido a diferentes tubos Falcon rotulados, pasado sus 72 horas de reposo. A partir de aquí, se obtuvieron diluciones 1:4 y 1:8 de los extractos etanólicos que presentaron colores más claros respecto a sus originales. Estas últimas fueron almacenadas y rotuladas para su posterior evaluación.

**Figura 4**

*Extractos etanólicos y diluciones de muestras recolectadas de arupo rosado y blanco*

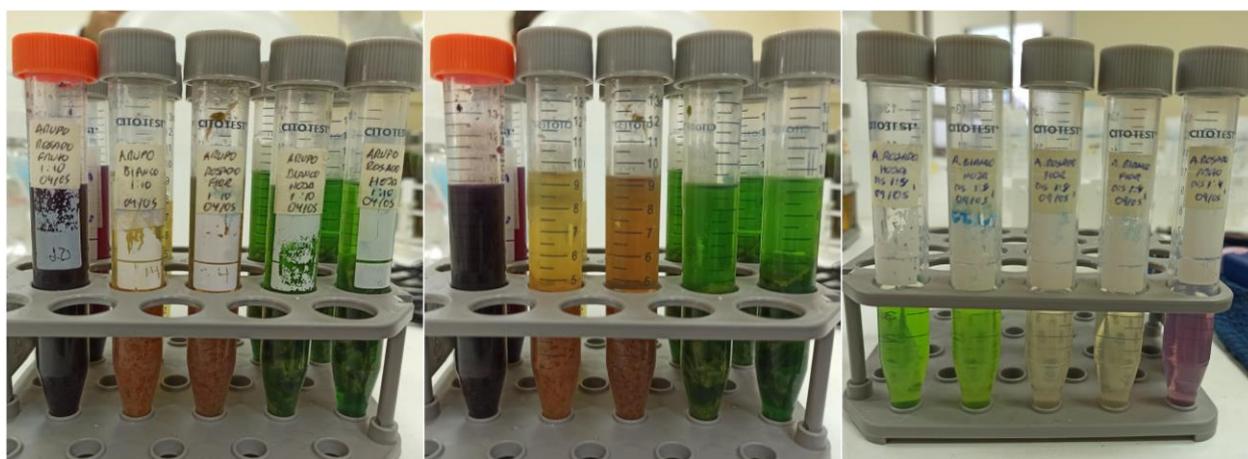


Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

### Evaluación del carácter antioxidante

Para el estudio de la capacidad antioxidante de las dos especies del género *Chionanthus* se empleó tres métodos para los extractos obtenidos.

#### ***Determinación del carácter antioxidante por el método DPPH***

El método emplea el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), una molécula estable soluble en solventes orgánicos (metanol, etanol, DMF) y caracterizada por su color púrpura intenso, que reacciona con los extractos al proporcionarle un electrón o átomo de hidrógeno y reduciéndolo a 2,2-difenil-1-hidrazina (DPPH-H) o una hidrazina análoga sustituida (DPPH-R) caracterizada por un

color amarillo pálido o incoloro (Mfotie, 2021). Esta decoloración (figura 5) permitió medir la capacidad de inhibición de RL por parte de las muestras.

### Figura 5

*Método DPPH aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco*

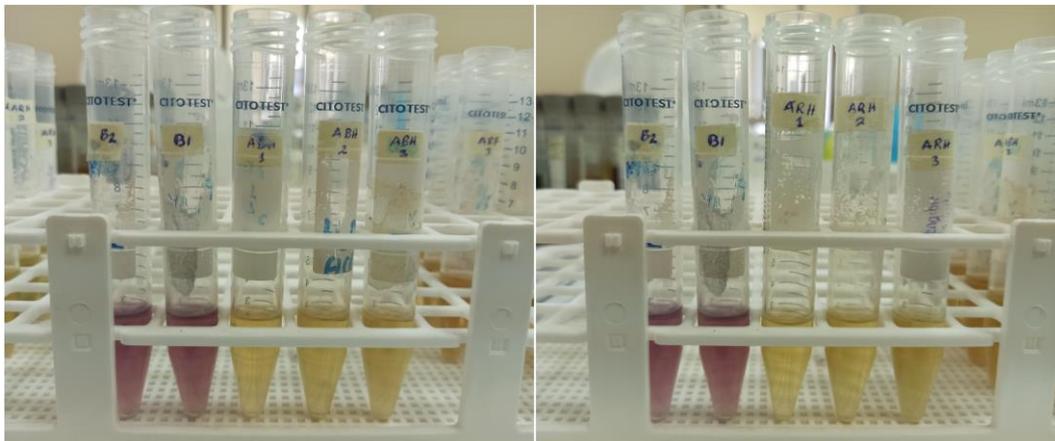


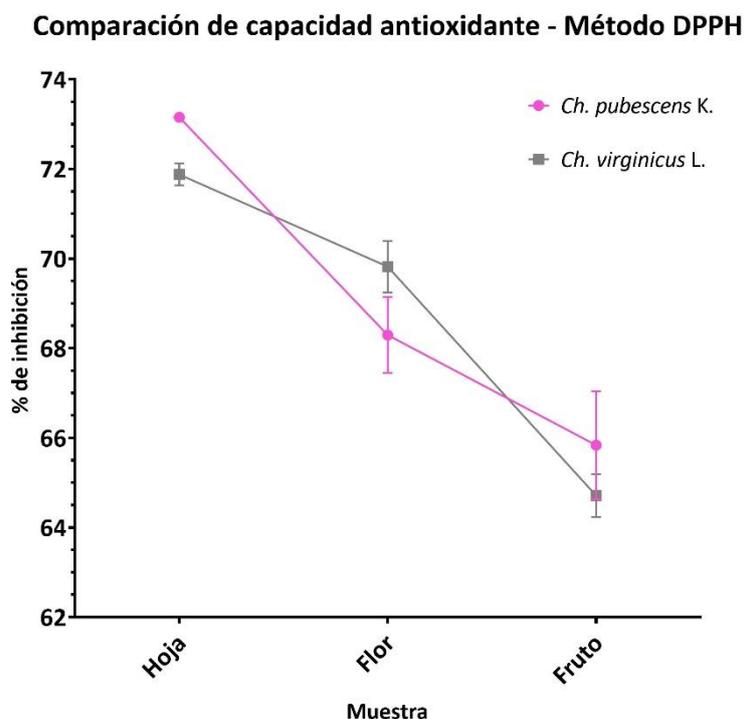
Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

Se obtuvo la curva de calibración usando como solución estándar Trolox en un rango de concentraciones de 0 a 0,625 mM. Su linealidad se expresó mediante la ecuación:  $y = -0,9979x + 0,7211$  ( $R^2 = 0,993$ ).

El método presentó como resultado una mayor inhibición de radicales libres en las hojas de *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L. respecto al resto de muestras, con valores promedio de 73,15% y 71,88%, respectivamente, como se observa en la figura 6. Las flores de ambos ejemplares mostraron un carácter antioxidante de 68,29% y 69,82%, siendo el arupo blanco ligeramente superior. Los frutos de las dos especies mostraron el menor porcentaje de inhibición respecto al resto de muestras, los promedios obtenidos fueron de 65,74% y 64,71%, siendo el arupo rosado el de mayor porcentaje.

Figura 6

Capacidad antioxidante (% de inhibición) de muestras de arupo rosado y blanco por método DPPH



Elaborado por: Alejandro Espinoza (2023)

Los porcentajes de inhibición resultantes con el método fueron procesados mediante la curva de calibración (Apéndice 1) para expresar los valores en unidades de  $\mu\text{mol Trolox/g fw}$ . Los resultados se resumen en la figura 7, donde las mejores actividades las presentaron las hojas de ambas especies con  $18,94 \mu\text{mol Trolox/g fw}$  para el arupo rosado y  $18,61 \mu\text{mol Trolox/g fw}$  para el arupo blanco.

Figura 7

Resumen de medidas descriptivas de la capacidad antioxidante de muestras de arupo rosado y

blanco **Medidas resumen**

| Muestra | Variable                 | n | Media | D.E. | E.E. | Mediana |
|---------|--------------------------|---|-------|------|------|---------|
| ABF     | $\mu\text{mol trolox/g}$ | 5 | 18,09 | 0,15 | 0,07 | 18,17   |
| ABFr    | $\mu\text{mol trolox/g}$ | 5 | 16,80 | 0,12 | 0,05 | 16,76   |
| ABH     | $\mu\text{mol trolox/g}$ | 5 | 18,61 | 0,06 | 0,03 | 18,58   |
| ARF     | $\mu\text{mol trolox/g}$ | 5 | 17,71 | 0,21 | 0,10 | 17,71   |
| ARFr    | $\mu\text{mol trolox/g}$ | 5 | 17,08 | 0,31 | 0,14 | 17,11   |
| ARH     | $\mu\text{mol trolox/g}$ | 5 | 18,94 | 0,02 | 0,01 | 18,93   |

Tras verificar los supuestos para hacer uso del ANOVA, se verificó que los datos no cumplían con la homocedasticidad (Apéndice 2), por tal motivo se procedió a realizar pruebas no paramétricas. El análisis de varianza no paramétrica (prueba de Kruskal Wallis) que se muestra en la figura 8 determinó que, a un nivel de significancia de 0,05 y con un  $P_{valor} < 0,0001$ , existe diferencia significativa en la capacidad antioxidante de las muestras de ambas especies del género *Chionanthus*.

### Figura 8

*Análisis de varianza no paramétrica de la capacidad antioxidante por el método DPPH*

#### Prueba de Kruskal Wallis

| Variable | Muestra | N | Medias | D.E.    | Medianas | C    | H     | p       |
|----------|---------|---|--------|---------|----------|------|-------|---------|
| Abs      | ABF     | 5 | 0,23   | 4,3E-03 | 0,22     | 1,00 | 27,46 | <0,0001 |
| Abs      | ABFr    | 5 | 0,26   | 3,6E-03 | 0,26     |      |       |         |
| Abs      | ABH     | 5 | 0,21   | 1,8E-03 | 0,21     |      |       |         |
| Abs      | ARF     | 5 | 0,24   | 0,01    | 0,24     |      |       |         |
| Abs      | ARFr    | 5 | 0,25   | 0,01    | 0,25     |      |       |         |
| Abs      | ARH     | 5 | 0,20   | 6,0E-04 | 0,20     |      |       |         |

La prueba de Kruskal Wallis realiza una comparación de a pares entre las medianas para diferenciar los resultados analizados. La figura 9 muestra que la hoja de *Ch. pubescens* K. (ARH) presenta la mayor capacidad de inhibición de RL, mientras que el fruto de *Ch. virginicus* L. (ABFr) la menor de todas. El resto de muestras no difieren significativamente dentro de cada especie.

### Figura 9

*Comparación de medianas de la capacidad antioxidante por el método DPPH*

| Trat. | Medianas | Ranks |   |   |   |
|-------|----------|-------|---|---|---|
| ARH   | 0,20     | 3,00  | A |   |   |
| ABH   | 0,21     | 8,00  | A | B |   |
| ABF   | 0,22     | 13,30 | A | B | C |
| ARF   | 0,24     | 17,70 | B | C | D |
| ARFr  | 0,25     | 24,20 |   | C | D |
| ABFr  | 0,26     | 26,80 |   |   | D |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Determinación del carácter antioxidante por el método ABTS

El ensayo utiliza el catión radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o ABTS<sup>•+</sup> obtenido a partir de la reacción entre persulfato de potasio y la solución ABTS.

**Figura 10**

*Método ABTS aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco*

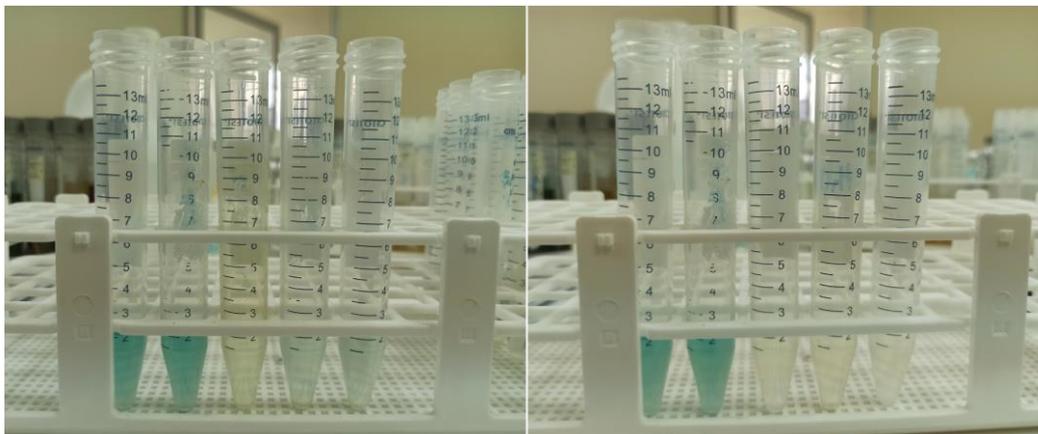


Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

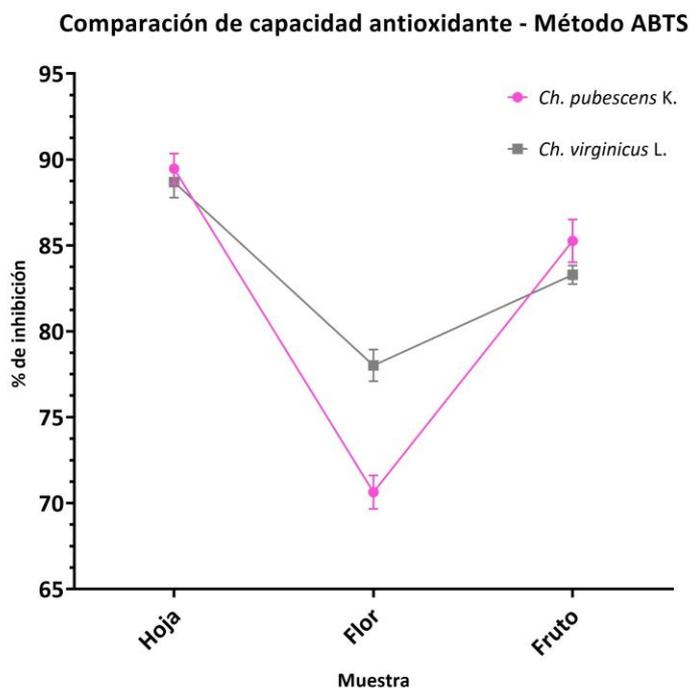
La prueba se basa en la decoloración del catión radical verde-azulado al reaccionar con antioxidantes contenidos en una muestra y convertirse en su forma neutra incolora (ABTS) (Mfotie, 2021). En la figura 10 se evidencia la decoloración de las muestras tras la aplicación del método.

La curva de calibración utilizando como estándar el Trolox, con rango de concentraciones de 0 a 2,5 mM, expresó su linealidad mediante la ecuación:  $y = -0,2489x + 0,7533$  ( $R^2 = 0,969$ ).

El ensayo presentó como resultado una mayor inhibición del catión radical ABTS en las hojas de ambas especies de arupo frente al resto de muestras, con valores promedio de 89,47% y 88,69%, siendo *Ch. pubescens* K. el mayor entre las mismas (figura 11). Los frutos de ambos individuos mostraron un carácter antioxidante de 85,27% y 83,29%, siendo el arupo rosado ligeramente superior al arupo blanco.

Figura 11

Capacidad antioxidante (% de inhibición) de muestras de arupo rosado y blanco por método ABTS



Elaborado por: Alejandro Espinoza (2023)

Las flores en este ensayo mostraron el menor porcentaje de inhibición con promedios de 70,64% y 78,02%, siendo el *Ch. virginicus* L. el de mayor capacidad respecto a este órgano vegetal.

Los porcentajes de barrido de RL resultantes fueron procesados mediante la curva de calibración (Apéndice 3) y los valores expresados en unidades de  $\mu\text{mol Trolox/g fw}$ . Los resultados se muestran en la figura 12. Las mejores actividades se observaron en hojas de ambas especies con un promedio de  $106,90 \mu\text{mol Trolox/g fw}$  del arupo rosado, seguido por el arupo blanco con  $105,93 \mu\text{mol Trolox/g fw}$ . Los valores más bajos en este caso lo presentaron las flores con promedios de  $83,37$  y  $92,59 \mu\text{mol Trolox/g fw}$ , siendo las flores del arupo rosado la menor concentración de todas las muestras.

Figura 12

Resumen de medidas descriptivas de la capacidad antioxidante de muestras de arupo rosado y blanco

**Medidas resumen**

| Muestra | Variable      | n | Media  | D.E. | E.E. | Mediana |
|---------|---------------|---|--------|------|------|---------|
| ABF     | µmol trolox/g | 5 | 92,59  | 1,15 | 0,51 | 92,89   |
| ABFr    | µmol trolox/g | 5 | 99,18  | 0,68 | 0,31 | 98,97   |
| ABH     | µmol trolox/g | 5 | 105,93 | 1,13 | 0,51 | 106,26  |
| ARF     | µmol trolox/g | 5 | 83,37  | 1,21 | 0,54 | 82,89   |
| ARFr    | µmol trolox/g | 5 | 101,65 | 1,56 | 0,70 | 101,90  |
| ARH     | µmol trolox/g | 5 | 106,90 | 1,11 | 0,50 | 106,76  |

Tras verificar los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de datos (Apéndice 4), se verifico que podría aplicarse el ANOVA, sin embargo, por el tamaño de muestra se optó por métodos no paramétricos. Tras el análisis de varianza, mostrado en la figura 13, se determinó que a un nivel de significancia de 0,05 y con un  $P_{valor} < 0,0001$ , existe diferencia significativa en la capacidad antioxidante de las muestras en el ensayo ABTS.

Figura 13

Análisis de varianza no paramétrica de la capacidad antioxidante por el método ABTS

**Prueba de Kruskal Wallis**

| Variable | Muestra | N | Medias | D.E.    | Medianas | C    | H     | p       |
|----------|---------|---|--------|---------|----------|------|-------|---------|
| Abs      | ABF     | 5 | 0,17   | 0,01    | 0,16     | 1,00 | 27,40 | <0,0001 |
| Abs      | ABFr    | 5 | 0,13   | 4,1E-03 | 0,13     |      |       |         |
| Abs      | ABH     | 5 | 0,09   | 0,01    | 0,08     |      |       |         |
| Abs      | ARF     | 5 | 0,22   | 0,01    | 0,22     |      |       |         |
| Abs      | ARFr    | 5 | 0,11   | 0,01    | 0,11     |      |       |         |
| Abs      | ARH     | 5 | 0,08   | 0,01    | 0,08     |      |       |         |

La prueba de Kruskal Wallis permite la comparación entre las medianas para identificar los resultados estadísticamente diferentes. La figura 14 evidencia no existe diferencia significativa entre las muestras de cada especie. La hoja de *Ch. pubescens* K. (ARH) y de *Ch. virginicus* L. (ABH) presentan estadísticamente similar capacidad de inhibición del catión radical ABTS, siendo la mayor del grupo de muestras.

Figura 14

*Comparación de medianas de la capacidad antioxidante por el método ABTS*

| Trat. | Medianas | Ranks |     |
|-------|----------|-------|-----|
| ARH   | 0,08     | 4,60  | A   |
| ABH   | 0,08     | 6,40  | A   |
| ARFr  | 0,11     | 13,20 | A B |
| ABFr  | 0,13     | 17,80 | B C |
| ABF   | 0,16     | 23,00 | B C |
| ARF   | 0,22     | 28,00 | C   |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### ***Determinación del carácter antioxidante por el método FRAP***

El método FRAP permite medir el poder antioxidante mediante la reducción a bajo pH (3,60) de tripiridiltriazina férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ), de color amarillento, a un complejo tripiridiltriazina ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), de color azul intenso (Mfotie, 2021). Esta coloración característica del ensayo se muestra en la figura 15.

Figura 15

*Método FRAP aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco*

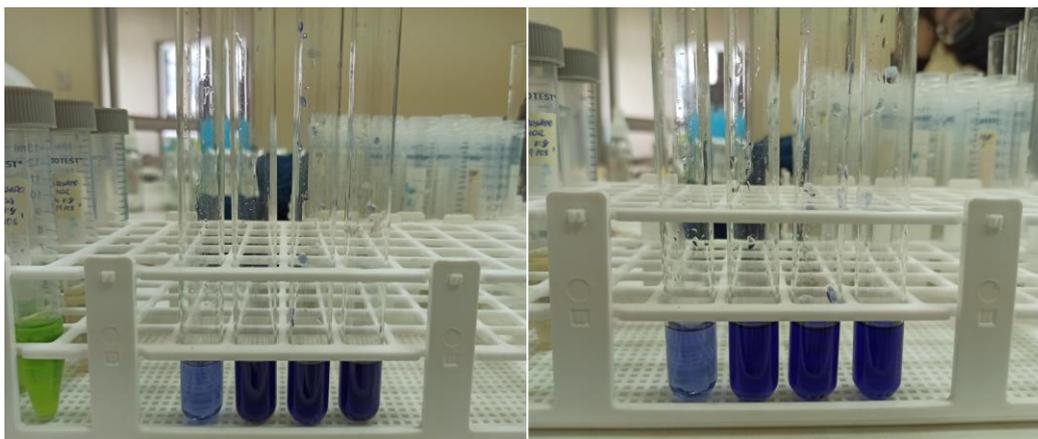


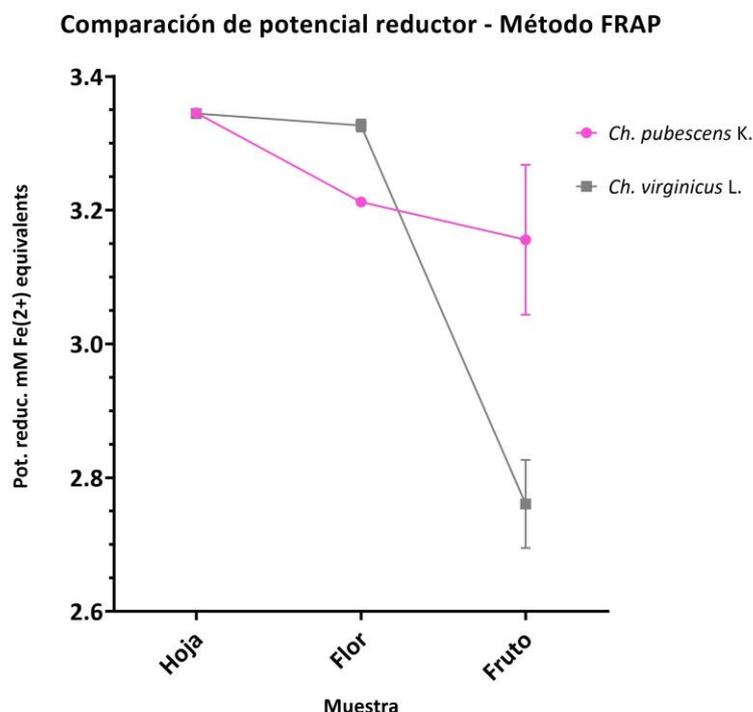
Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

Se obtuvo la curva de calibración usando como solución estándar  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en un rango de concentración de 0 a 5 mM. Su linealidad se expresó mediante la ecuación:  $y = 0,7056x - 0,028$  ( $R^2 = 0,999$ ).

El ensayo presentó como resultado una mayor capacidad de reducción del ion férrico en las hojas de ambas especies del género *Chionanthus* frente al resto de órganos vegetales (figura 16), con promedios de 3,346 y 3,344 mM equivalentes de Fe(2+). Las flores de *Ch. virginicus* L. mostraron una ligera mayor capacidad reductora frente a las flores de *Ch. pubescens* K. con valores de 3,327 y 3,212 mM equivalentes de Fe(2+), respectivamente. Los frutos de ambas especies presentaron los menores valores del ensayo, con promedios de 3,156 y 2,761 mM equivalentes de Fe(2+), siendo el fruto del arupo blanco el del menor poder reductor de todas las muestras.

**Figura 16**

*Potencial reductor del ión férrico de muestras de arupo rosado y blanco por método FRAP*



Elaborado por: Alejandro Espinoza (2023)

Los resultados obtenidos con el ensayo fueron procesados mediante la curva de calibración (Apéndice 5) y expresados en unidades de mg Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100 g fw y presentados en la figura 17. Los mejores potenciales reductores fueron los de las hojas de arupo rosado y blanco, con promedios de 930,102 y 929,786 mg Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100 g fw, respectivamente.

**Figura 17**

Resumen de medidas descriptivas de la capacidad antioxidante de muestras de arupo rosado y blanco

**Medidas resumen**

| Muestra | Variable                                    | n | Media  | D.E.  | E.E.  | Mediana |
|---------|---|---|--------|-------|-------|---------|
| ABF     | mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw | 5 | 924,87 | 2,49  | 1,11  | 924,40  |
| ABFr    | mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw | 5 | 767,51 | 18,32 | 8,19  | 777,31  |
| ABH     | mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw | 5 | 929,79 | 0,68  | 0,30  | 929,92  |
| ARF     | mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw | 5 | 893,07 | 0,51  | 0,23  | 893,14  |
| ARFr    | mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw | 5 | 877,33 | 31,16 | 13,94 | 880,67  |
| ARH     | mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw | 5 | 930,10 | 0,78  | 0,35  | 929,92  |

El menor potencial reductor lo mostró el fruto de *Ch. virginicus* L. con 767,509 mg Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100 g fw, valor inferior respecto al de su pariente andino.

Tras verificar los supuestos para hacer uso del ANOVA, se verificó que los datos no cumplieran con la normalidad y homocedasticidad (Apéndice 6), por tal motivo se procedió a realizar pruebas no paramétricas. El análisis de varianza no paramétrica (Kruskal Wallis) en la figura 18 determinó que, a un nivel de significancia de 0,05 y con un P<sub>valor</sub> de 0,0001, existe diferencia significativa en el potencial reductor de las muestras estudiadas del género *Chionanthus*.

**Figura 18**

Análisis de varianza no paramétrica del potencial reductor del ión férrico por el método FRAP

**Prueba de Kruskal Wallis**

| Variable | Muestra | N | Medias | D.E.    | Medianas | C    | H     | p      |
|----------|---------|---|--------|---------|----------|------|-------|--------|
| Abs      | ABF     | 5 | 2,32   | 0,01    | 2,32     | 1,00 | 26,74 | 0,0001 |
| Abs      | ABFr    | 5 | 1,92   | 0,05    | 1,94     |      |       |        |
| Abs      | ABH     | 5 | 2,33   | 1,7E-03 | 2,33     |      |       |        |
| Abs      | ARF     | 5 | 2,24   | 1,3E-03 | 2,24     |      |       |        |
| Abs      | ARFr    | 5 | 2,20   | 0,08    | 2,21     |      |       |        |
| Abs      | ARH     | 5 | 2,33   | 2,0E-03 | 2,33     |      |       |        |

La prueba de Kruskal Wallis permitió la comparación de a pares entre las medianas para diferenciar los resultados analizados. Según la figura 19, las muestras ARH, ABH y ABF no difieren

significativamente. Por otro lado, ABFr muestra una diferencia significativa del resto al ser el menor resultado del ensayo FRAP. Entre especies, estadísticamente no hay diferencia para cada muestra.

**Figura 19**

*Comparación de medianas del potencial reductor por el método FRAP*

| Trat. | Medianas | Ranks |   |     |
|-------|----------|-------|---|-----|
| ABFr  | 1,94     | 3,00  | A |     |
| ARFr  | 2,21     | 9,60  | A | B   |
| ARF   | 2,24     | 11,40 | A | B   |
| ABF   | 2,32     | 18,00 |   | B C |
| ABH   | 2,33     | 25,10 |   | C   |
| ARH   | 2,33     | 25,90 |   | C   |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### **Determinación del contenido de fenoles totales**

El ensayo de Folin-Ciocalteu o F-C es el método más común para el análisis fenólico, se basa en la reducción del reactivo de Folin (FCR) en presencia de fenoles de una muestra en evaluación, esta reacción resulta en la producción de azul de molibdeno-tungsteno como se observa en la figura 20, la intensidad aumenta linealmente con la concentración de fenólicos (Malta & Liu, 2014). Esta coloración permitió la cuantificación de fenoles en los distintitos órganos vegetales al medirlo espectrofotométricamente a 765 nm.

**Figura 20**

*Ensayo F-C aplicado a extractos etanólicos (1:8) de muestras de arupo rosado y blanco*

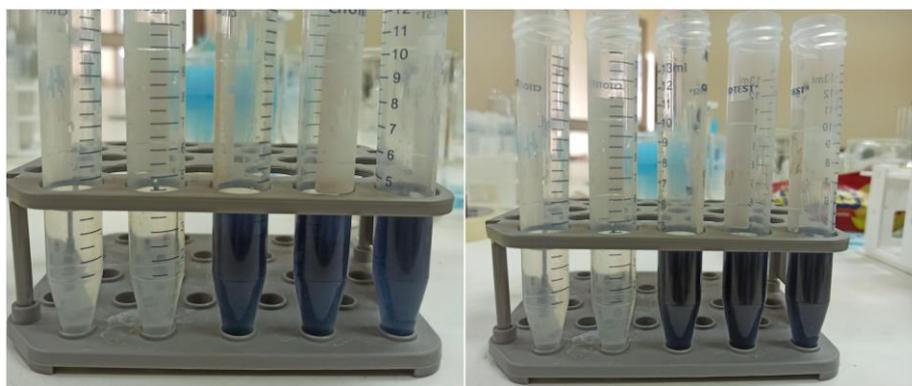


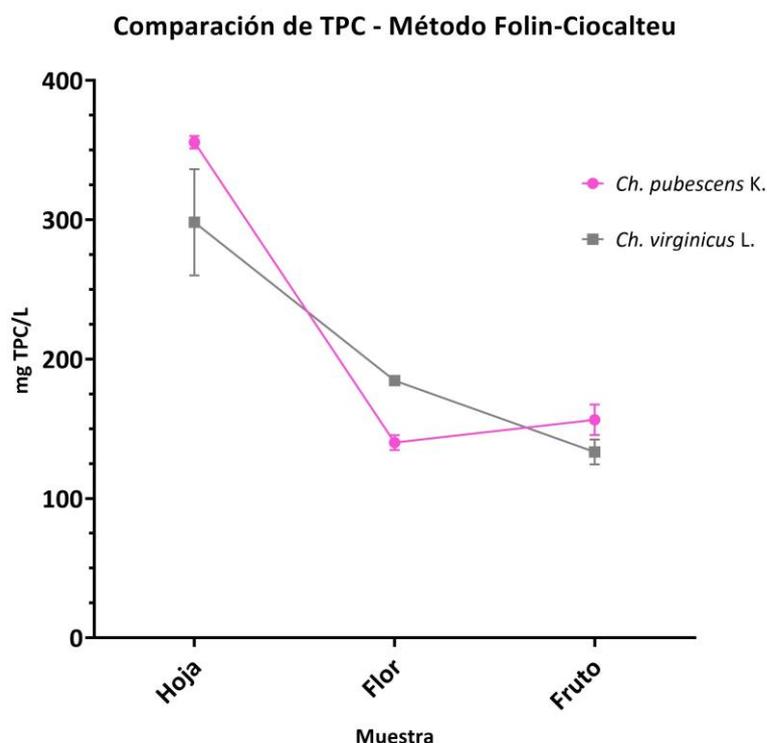
Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

Se obtuvo la curva de calibración utilizando como estándar ac. gálico en un rango de concentraciones de 0 a 250,0 mg/L. Su linealidad se expresó mediante la ecuación:  $y = 0,0112x - 0,1759$  ( $R^2 = 0,979$ ).

Mediante la curva de calibración (Apéndice 7) con el ácido gálico se obtuvieron como resultado un mayor contenido de fenoles en las muestras de hojas de ambas especies vegetales, con concentraciones promedio de 355,69 mg TPC/L de extracto en el caso del arupo rosado y 298,27 mg TPC/L para el árbol marginal (figura 21). Las flores muestran un mayor contenido en el arupo blanco con una concentración promedio de 184,57 mg TPC/L respecto a las del arupo rosado (140,13 mg TPC/L) que mantienen un contenido inferior al de sus propios frutos con (156,42 mg TPC/L). *Ch. virginicus* L. muestra el menor contenido de fenoles en su fruto (133,35 mg TPC/L).

**Figura 21**

Contenido de fenoles totales (TPC) de muestras de arupo rosado y blanco por método F-C



Elaborado por: Alejandro Espinoza (2023)

Los anteriores valores se expresaron en unidades de mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de muestra fresca y fueron resumidos en la figura 22. Los mejores promedios mostraron

concentraciones de 2845,55 y 2386,17 mg GAE/100 g fw para las muestras ARH Y ABH, respectivamente. La menor concentración reportada fue la muestra ABFr con 1066,83 mg GAE/100 g fw.

## Figura 22

*Resumen de medidas descriptivas de TPC de muestras de arupo rosado y blanco*

### Medidas resumen

| Muestra | Variable    | n | Media   | D.E.   | E.E.   | Mediana |
|---------|-------------|---|---------|--------|--------|---------|
| ABF     | mg GAE/100g | 5 | 1476,55 | 16,08  | 7,19   | 1485,55 |
| ABFr    | mg GAE/100g | 5 | 1066,83 | 71,03  | 31,77  | 1042,21 |
| ABH     | mg GAE/100g | 5 | 2386,17 | 305,30 | 136,53 | 2268,40 |
| ARF     | mg GAE/100g | 5 | 1121,07 | 41,95  | 18,76  | 1104,36 |
| ARFr    | mg GAE/100g | 5 | 1251,36 | 87,65  | 39,20  | 1310,07 |
| ARH     | mg GAE/100g | 5 | 2845,55 | 35,28  | 15,78  | 2826,98 |

Tras verificar los supuestos para hacer uso del ANOVA, se verificó que los datos no cumplían con la normalidad y homocedasticidad (Apéndice 8), por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas. La prueba de Kruskal Wallis (figura 23) determinó que, a un nivel de significancia de 0,05 y con un  $P_{valor}$  0,0001, existe diferencia significativa en la capacidad antioxidante de las muestras de ambas especies del arupo.

## Figura 23

*Análisis de varianza no paramétrica del contenido total de fenoles por el método F-C*

### Prueba de Kruskal Wallis

| Variable | Muestra | N | Medias | D.E. | Medianas | C    | H     | p      |
|----------|---------|---|--------|------|----------|------|-------|--------|
| Abs      | ABF     | 5 | 2,24   | 0,02 | 2,26     | 1,00 | 26,54 | 0,0001 |
| Abs      | ABFr    | 5 | 1,67   | 0,10 | 1,64     |      |       |        |
| Abs      | ABH     | 5 | 3,52   | 0,43 | 3,35     |      |       |        |
| Abs      | ARF     | 5 | 1,75   | 0,06 | 1,72     |      |       |        |
| Abs      | ARFr    | 5 | 1,93   | 0,12 | 2,01     |      |       |        |
| Abs      | ARH     | 5 | 4,16   | 0,05 | 4,13     |      |       |        |

La prueba de Kruskal Wallis permitió una comparación entre medianas para identificar diferencias significativas en los resultados del ensayo. Según la figura 24, las muestras ARH y ABH no

difieren significativamente, presentando los mayores contenidos de fenoles de todas las muestras. El contenido fenólico de los frutos y flores no son estadísticamente diferentes.

**Figura 24**

*Comparación de medianas del contenido de fenoles totales por el método F-C*

| Trat. | Medianas | Ranks |   |   |
|-------|----------|-------|---|---|
| ABFr  | 1,64     | 4,60  | A |   |
| ARF   | 1,72     | 7,00  | A |   |
| ARFr  | 2,01     | 12,40 | A | B |
| ABF   | 2,26     | 18,00 | B | C |
| ABH   | 3,35     | 24,00 |   | C |
| ARH   | 4,13     | 27,00 |   | C |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### **Determinación del contenido de flavonoides totales**

El ensayo utiliza el  $AlCl_3$ , donde el  $Al(III)$  actúa como un agente complejante o sustancia capaz de unirse a iones específicos. El método se basa en la formación de quelatos de  $Al(III)$ -flavonoides debido a la gran afinidad de sus enlaces oxo e hidroxilo por unirse a iones metálicos, dando como resultado la formación de complejos de color amarillento-pardusco como se aprecia en la figura 25 (Shraim et al., 2021). En el caso de los frutos se visualizó una coloración azul, aparentemente por la interacción del  $Al(III)$  con las antocianinas contenidas.

**Figura 25**

*Ensayo de  $AlCl_3$  aplicado a extractos etanólicos (1:4) de muestras de arupo rosado y blanco*

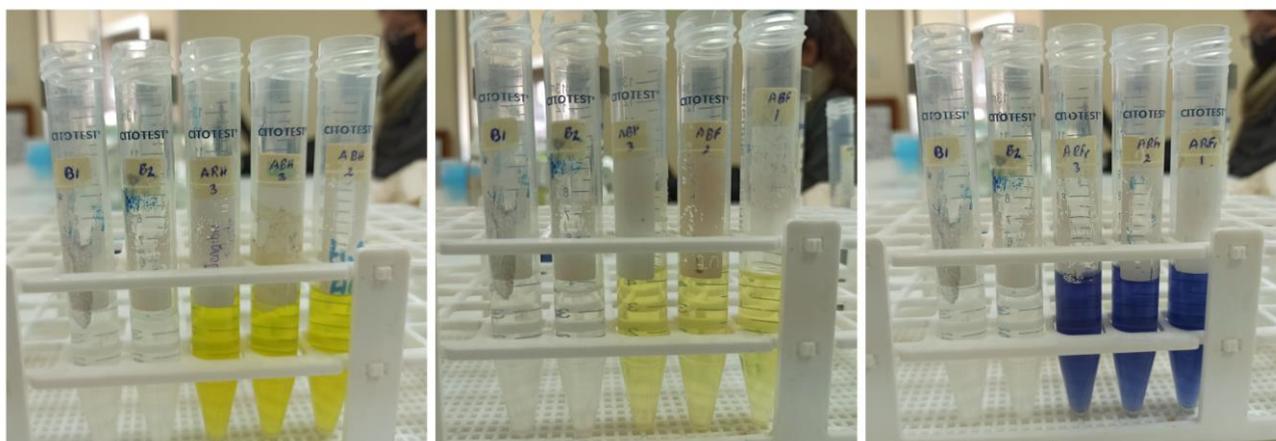


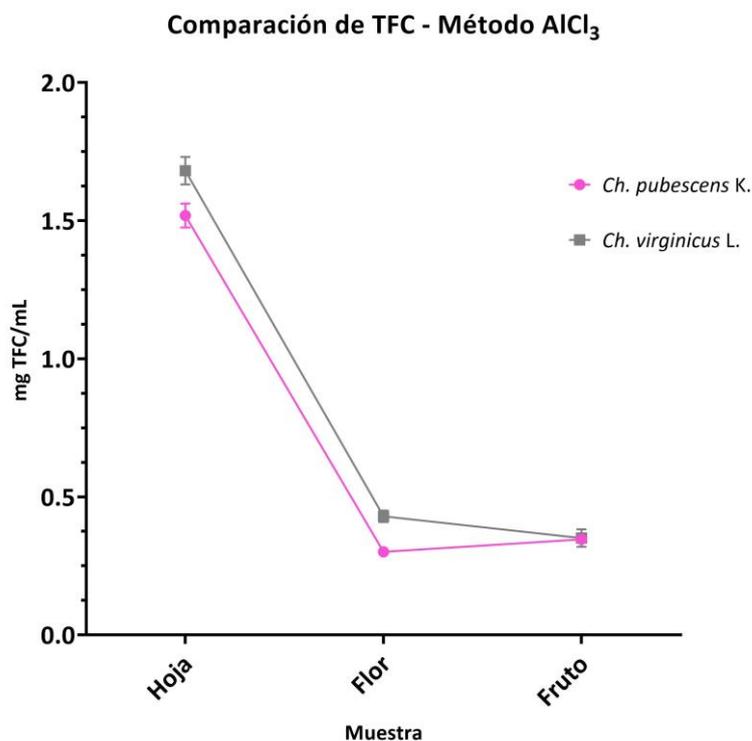
Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

Se obtuvo la curva de calibración (Apéndice 9) utilizando quercentina como solución estándar en un rango de concentración de 0 a 1,5 mg/mL. Su linealidad se expresó mediante la ecuación:  $y = 1,4566x - 0,0265$  ( $R^2 = 0,994$ ).

Los resultados obtenidos por el ensayo y representados en la figura 26 mostraron una mayor cantidad de flavonoides contenidos en las hojas de ambas especies de arupo, con promedios de 1,519 y 1,681 mg TFC/mL de extracto, siendo el árbol marginal ligeramente el mayor de ambos. En flores esta diferencia se volvió más notable con un contenido de 0,429 mg TFC/mL para el arupo blanco, seguido de 0,301 mg TFC/mL para la especie rosada. Las muestras de frutos mostraron valores cercanos entre las especies *Ch. virginicus* L. y *Ch. pubescens* K., con valores de 0,351 y 0,346 mg TFC/mL, respectivamente.

**Figura 26**

Contenido de flavonoides totales (TFC) de muestras de arupo rosado y blanco por ensayo  $AlCl_3$



Elaborado por: Alejandro Espinoza (2023)

Se utilizó la quercentina, un compuesto de referencia común, para expresar los resultados en unidades de mg equivalentes de quercentina por gramo de muestra fresca, estos se resumen en la figura 27. Las mejores concentraciones fueron los de las hojas, con promedios de 60,758 y 67,242 mg QE/ g fw. El contenido de todas las muestras del arupo blanco superaron ligeramente a las de su pariente andino en el ensayo.

### Figura 27

*Resumen de medidas descriptivas de TFC de muestras de arupo rosado y blanco*

#### Medidas resumen

| Muestra | Variable   | n | Media | D.E. | E.E. | Mediana |
|---------|------------|---|-------|------|------|---------|
| ABF     | mg QE/g fw | 5 | 17,19 | 0,86 | 0,38 | 17,36   |
| ABFr    | mg QE/g fw | 5 | 14,02 | 1,29 | 0,58 | 14,44   |
| ABH     | mg QE/g fw | 5 | 67,24 | 2,01 | 0,90 | 68,21   |
| ARF     | mg QE/g fw | 5 | 12,05 | 0,26 | 0,12 | 12,13   |
| ARFr    | mg QE/g fw | 5 | 13,83 | 0,39 | 0,17 | 13,93   |
| ARH     | mg QE/g fw | 5 | 60,76 | 1,74 | 0,78 | 61,09   |

El menor contenido lo mostró la flor de *Ch. pubescens* K. con 12,05 mg QE/g fw, incluso por debajo de su propio fruto.

Tras verificar los supuestos para hacer uso del ANOVA, se verificó que los datos no cumplían con la homocedasticidad (Apéndice 10), por tal motivo se procedió a realizar pruebas no paramétricas. El análisis de varianza no paramétrica de la figura 28 determinó que, a un nivel de significancia de 0,05 y con un  $P_{valor} < 0,0001$ , existe diferencia significativa en el contenido de flavonoides de las distintas muestras.

**Figura 28**

*Análisis de varianza no paramétrica del contenido total de flavonoides por el método  $AlCl_3$*

**Prueba de Kruskal Wallis**

| Variable | Muestra | N | Medias | D.E. | Medianas | C    | H     | p       |
|----------|---------|---|--------|------|----------|------|-------|---------|
| Abs      | ABF     | 5 | 0,65   | 0,03 | 0,66     | 1,00 | 27,45 | <0,0001 |
| Abs      | ABFr    | 5 | 0,54   | 0,05 | 0,55     |      |       |         |
| Abs      | ABH     | 5 | 2,48   | 0,07 | 2,51     |      |       |         |
| Abs      | ARF     | 5 | 0,47   | 0,01 | 0,47     |      |       |         |
| Abs      | ARFr    | 5 | 0,53   | 0,01 | 0,53     |      |       |         |
| Abs      | ARH     | 5 | 2,24   | 0,06 | 2,25     |      |       |         |

La prueba de Kruskal Wallis permitió la comparación de a pares entre las medianas para detectar diferencias significativas. Según la figura 29, las muestras ARH y ABH no difieren significativamente. De igual forma, las muestras ABFr, ARFr y ARF no son estadísticamente diferentes.

**Figura 29**

*Comparación de medianas del contenido de flavonoides totales por el método  $AlCl_3$*

| Trat. | Medianas | Ranks |   |   |
|-------|----------|-------|---|---|
| ARF   | 0,47     | 3,00  | A |   |
| ARFr  | 0,53     | 10,00 | A | B |
| ABFr  | 0,55     | 11,00 | A | B |
| ABF   | 0,66     | 18,00 | B | C |
| ARH   | 2,25     | 23,00 |   | C |
| ABH   | 2,51     | 28,00 |   | C |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Determinación del contenido de antocianinas totales**

El método de diferencial de pH se basa en los cambios estructurales reversibles de las antocianinas monoméricas al manipular el pH en las muestras. El color de la antocianina depende de la carga positiva en el anillo C de la molécula, a un pH de 1,0 la molécula se carga positivamente y pigmenta, mientras que, a un pH de 4,5 o mayor se neutraliza e incolora. La concentración de este

pigmento es proporcional a la diferencia de absorbancias a 520 nm en distinto pH (Taghavi et al., 2022). La figura 30 muestra la diferencia de pigmentación tras aplicar el ensayo.

**Figura 30**

*Ensayo de diferencial de pH aplicado a muestras frescas de arupo rosado y blanco*

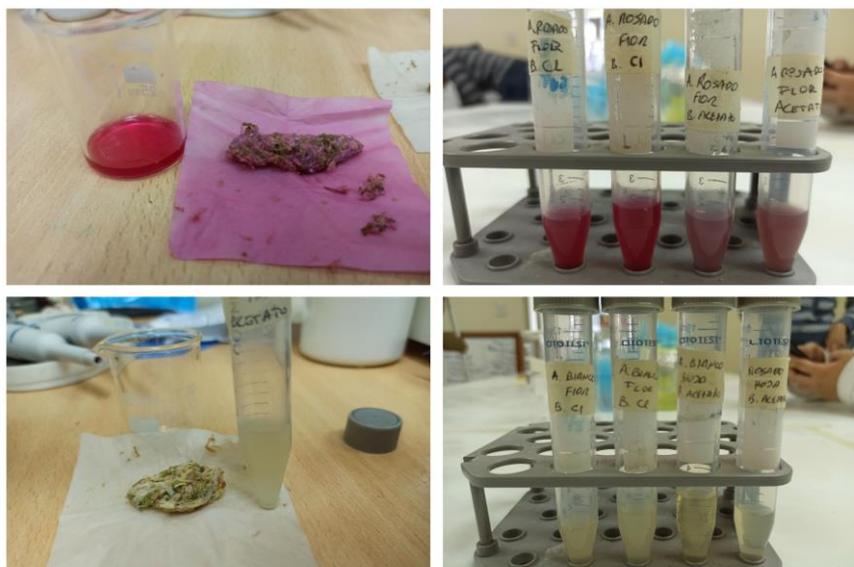


Foto tomada por: Alejandro Espinoza (2023)

Utilizando la fórmula 2 en la metodología, se obtuvo la diferencia de absorbancia de los pigmentos en las muestras de flores y frutos de las especies evaluadas. La fórmula 3 permitió presentar los resultados en unidades de miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por litro de extracto, estos se resumen en la figura 31.

**Figura 31**

*Resumen de medidas descriptivas de CAT en muestras (flores y frutos) de arupo rosado y blanco*

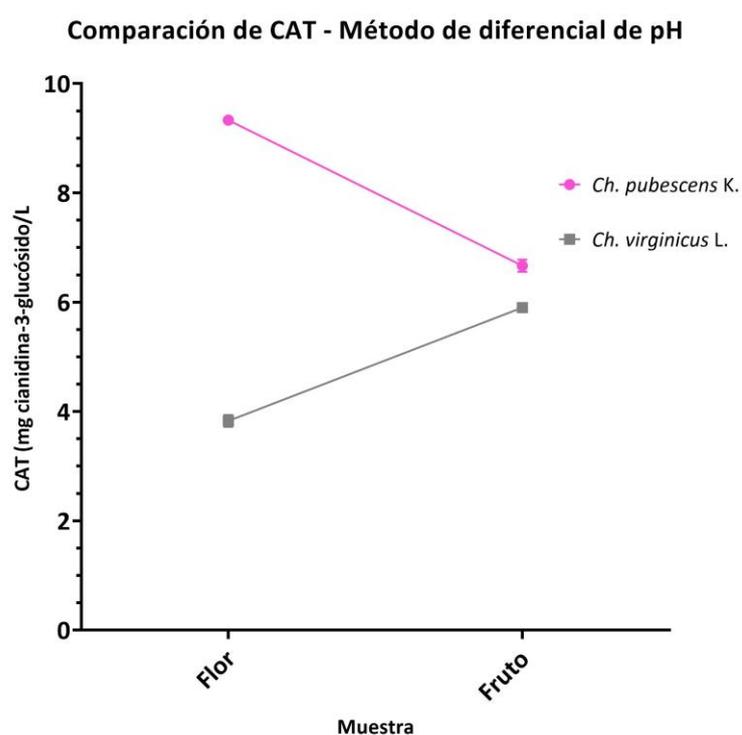
**Medidas resumen**

| Muestra | Variable                     | n | Media | D.E. | E.E. | Mediana |
|---------|------------------------------|---|-------|------|------|---------|
| ABF     | mg cianidina-3-glucosido/L.. | 3 | 3,83  | 0,11 | 0,06 | 3,86    |
| ABFr    | mg cianidina-3-glucosido/L.. | 3 | 5,90  | 0,08 | 0,04 | 5,89    |
| ARF     | mg cianidina-3-glucosido/L.. | 3 | 9,33  | 0,04 | 0,02 | 9,33    |
| ARFr    | mg cianidina-3-glucosido/L.. | 3 | 6,67  | 0,11 | 0,06 | 6,70    |

La figura 32 muestra una mayor concentración de antocianinas monoméricas en las flores del *Ch. pubescens* K. respecto a las de su pariente norteamericano, con promedios de 9,332 y 3,827 mg cianidina-3-glucósido/L de extracto, respectivamente. Respecto a la muestra de frutos, el contenido de antocianinas no difiere mucho entre las especies, con un promedio de 6,668 y 5,900 mg cianidina-3-glucósido/L para el arupo rosado y blanco, respectivamente.

**Figura 32**

*Contenido de antocianinas totales (CAT) de muestras de arupo rosado y blanco*



Elaborado por: Alejandro Espinoza (2023)

Debido al número de observaciones obtenidas se optó por realizar pruebas no paramétricas. La prueba de Kruskal Wallis la figura 33 determinó que, a un nivel de significancia de 0,05 y con un  $P_{valor}$  de 0,0156, existe diferencia significativa en el contenido total de antocianinas de las cuatro muestras.

**Figura 33**

*Análisis de varianza no paramétrica del CAT por el método de diferencial de pH*

**Prueba de Kruskal Wallis**

| Variable | Muestra | N | Medias | D.E.    | Medianas | C    | H     | p      |
|----------|---------|---|--------|---------|----------|------|-------|--------|
| Abs      | ABF     | 3 | 0,23   | 0,01    | 0,23     | 1,00 | 10,38 | 0,0156 |
| Abs      | ABFr    | 3 | 0,35   | 4,5E-03 | 0,35     |      |       |        |
| Abs      | ARF     | 3 | 0,56   | 2,3E-03 | 0,56     |      |       |        |
| Abs      | ARFr    | 3 | 0,40   | 0,01    | 0,40     |      |       |        |

El análisis de varianza no paramétrico permitió la comparación de a pares entre las medianas. Según la figura 34, las muestras de flores de ambas especies difieren significativamente, mientras que los frutos no difieren estadísticamente.

**Figura 34**

*Comparación de medianas del contenido de antocianinas totales por el método de diferencial de pH*

| Trat. | Medianas | Ranks |   |   |
|-------|----------|-------|---|---|
| ABF   | 0,23     | 2,00  | A |   |
| ABFr  | 0,35     | 5,00  | A | B |
| ARFr  | 0,40     | 8,00  | B | C |
| ARF   | 0,56     | 11,00 |   | C |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Correlación de Pearson entre ensayos**

El coeficiente de correlación de Pearson permite medir la fuerza de la relación lineal entre dos o más variables. La prueba da como resultado un valor entre -1 y 1, donde -1 significa una correlación lineal negativa total, 1 una correlación positiva total y 0 que no existe correlación (Nettleton, 2014). Si dos variables muestran un mismo valor positivo significa que existe una relación positiva entre ambas (si una aumenta la otra también) y un valor negativo que su relación es negativa (efecto opuesto).

La figura 35 muestra que existe una fuerte correlación positiva entre FRAP, TPC y TFC con el ensayo DPPH debido a sus coeficientes cercanos a 1, junto su probabilidad inferior a 0,05. Por otro lado, el método mostró una correlación negativa con CAT.

El ensayo ABTS tuvo una correlación positiva con TPC y TFC, al contrario que con CAT. Por último, el ensayo FRAP mostro correlacionarse ligeramente de forma positiva con TPC y TFC, al igual que de forma negativa con CAT.

### Figura 35

*Coefficientes de correlación de Pearson aplicados a los métodos de determinación del carácter antioxidante y composición metabólica (TPC, TFC y CAT)*

#### Coefficientes de correlación

*Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades*

|      | DPPH  | ABTS  | FRAP    | TPC     | TFC     | CAT     |
|------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|
| DPPH | 1,00  | 0,09  | 1,7E-08 | 9,2E-10 | 3,8E-08 | 9,4E-07 |
| ABTS | 0,32  | 1,00  | 0,68    | 5,4E-05 | 1,4E-05 | 3,0E-07 |
| FRAP | 0,83  | 0,08  | 1,00    | 4,4E-04 | 2,5E-03 | 0,01    |
| TPC  | 0,86  | 0,67  | 0,60    | 1,00    | 0,00    | 1,8E-11 |
| TFC  | 0,82  | 0,71  | 0,53    | 0,93    | 1,00    | 5,9E-12 |
| CAT  | -0,76 | -0,78 | -0,48   | -0,90   | -0,91   | 1,00    |

### Determinación del peso seco

Se secaron las muestras de ambas especies de arupo y los datos junto con su promedio se resumieron en la tabla 8.

**Tabla 8***Resumen de pesos frescos y secos de muestras de arupo rosado y blanco*

| Muestra | Rep | Peso fresco (g) | Peso seco (g) | % de humedad |
|---------|-----|-----------------|---------------|--------------|
|         | 1   | 1,008           | 0,541         |              |
| ARH     | 2   | 1,012           | 0,477         | 48,66±3,65   |
|         | 3   | 1,015           | 0,540         |              |
|         | 1   | 1,015           | 0,398         |              |
| ABH     | 2   | 1,009           | 0,391         | 61,70±1,21   |
|         | 3   | 1,010           | 0,373         |              |
|         | 1   | 1,001           | 0,172         |              |
| ARF     | 2   | 1,000           | 0,183         | 81,33±1,71   |
|         | 3   | 1,013           | 0,208         |              |
|         | 1   | 1,001           | 0,218         |              |
| ABF     | 2   | 1,016           | 0,203         | 80,53±2,59   |
|         | 3   | 1,008           | 0,168         |              |
|         | 1   | 1,228           | 0,539         |              |
| ARFr    | 2   | 1,255           | 0,500         | 59,34±2,92   |
|         | 3   | 1,721           | 0,658         |              |
|         | 1   | 1,148           | 0,478         |              |
| ABFr    | 2   | 1,211           | 0,581         | 54,93±3,20   |
|         | 3   | 1,327           | 0,605         |              |

## Capítulo V: Discusión de los resultados

La identificación de compuestos bioactivos y sus potenciales beneficios han sido recurrentes en la investigación científica durante las últimas décadas, principalmente por su atención en las propiedades antioxidantes y su uso potencial en la salud e industria alimenticia (Dincheva et al., 2023). De un estimado de 374.000 especies de plantas que han sido descritas y nombradas científicamente hasta la actualidad, solo una fracción de ellas han sido estudiadas fitoquímicamente o evaluadas por su actividad biológica (Haruna & Yahaya, 2021; Borges et al., 2020).

La ubicación geográfica y características geológicas de nuestro país convierten a su biodiversidad en una de las más ricas del mundo, representando alrededor del 10% de todas las especies vegetales y sumando nuevas cada año, convirtiendo al país en una fuente invaluable de potenciales productos naturales de interés biológico e industrial (Armijos et al., 2021). De entre estas especies, en este trabajo se ha puesto en evaluación el potencial antioxidante de dos miembros del género *Chionanthus*: el arupo rosado (*Chionanthus pubescens* K.) un árbol nativo del sur del país y al árbol marginal (*Chionanthus virginicus* L.) o también conocido como arupo blanco, una especie introducida de los Estados Unidos que ha logrado adaptarse a las condiciones de la región andina; ambos usados principalmente de forma ornamental (Romero et al., 2021).

Holzmeyer et al. (2020) menciona que, de las especies vegetales conocidas, se han descubierto más de 200.000 compuestos biológicamente activos a partir de sus distintos órganos vegetales (hojas, raíces, cortezas, frutos y semillas). Se recolectaron las hojas, flores y frutos (figura 3) en estado maduro de individuos aleatorios de ambas especies dentro de la Universidad de las Fuerzas Armadas. La recolección de sus muestras se completó en diferentes ocasiones por la naturaleza caducifolia, el florecimiento anual y posterior etapa de fructificación que presentan ambos ejemplares, junto con su aleatoriedad del acontecimiento respecto a cada rama, como lo menciona Romero et al. (2021).

Se obtuvieron extractos etanólicos (figura 4) con colores distintivos por cada muestra en consecuencia de la capacidad de los alcoholes para disolver y extraer los distintos pigmentos junto con el resto de los metabolitos secundarios (Ahmadi et al., 2019). Este método de extracción es oportuno para muestras frágiles como flores y donde el metanol es el solvente comúnmente utilizado para el análisis metabolómico (Kapadia et al., 2022; Verpoorte et al., 2022). Se considera esto debido a que en la bibliografía existente respecto a *Ch. virginicus* L. se ha empleado MeOH para su investigación, siendo una diferencia a considerar para la comparación de resultados de este trabajo. Borges et al. (2020) tras comparar solventes en *Olea europea* (*Oleaceae*) determinó que el metanol tiene mejor eficiencia de extracción (7,2%) frente al etanol (4,1%). No obstante, ambos solventes suelen presentar problemas de impurezas al reaccionar con ácidos grasos y generar ésteres, acetales y hemiacetales (Verpoorte et al., 2022).

Los resultados del carácter antioxidante empleando el ensayo de DPPH mostraron un mayor porcentaje de inhibición de radicales libres por parte de los extractos de hojas de ambas especies, con valores de 73,15% y 71,88% para el arupo rosado y blanco respectivamente. Gülçin et al. (2006), Gülçin et al. (2007) y Gülçin et al. (2008) realizaron tres investigaciones donde evaluó la actividad antioxidante de extractos con distintos solventes (metanol y etil acetato), lignanos aislados (phillyrin, pinosinol- $\beta$ -D-glucósido o PDG, y pinosinol-di- $\beta$ -glucósido o PDDG) y secoiridoides (ligustrosido, oleuropeína) a partir de la corteza de la raíz del árbol marginal. Los extractos (20  $\mu$ g/mL) en evaluación mostraron porcentajes de inhibición del 86,6% (metanol), 39,2% (etil acetato), 85,2% (PDG), 85,1% (PDDG), 51,0% (phillyrin), 83,7% (ligustrosido) y 32,8% (oleuropeína).

Considerando el distinto solvente utilizado por el autor, la concentración de extractos mediante rotavapor, el aislamiento de metabolitos por LPLC (cromatografía líquida a baja presión) y la relación RL-AH (1:3) en los ensayos los resultados muestran concordancia con los obtenidos. Litescu et al., (2010) menciona que se denomina antioxidante a compuestos que en bajas concentraciones es capaz de retrasar o bloquear significativamente la oxidación y que al hablar de

“capacidad” antioxidante- consideramos la reacción entre una solución (mezcla de compuestos) a diferencia de “actividad” (una sola especie).

Para el ensayo ABTS, Boyer et al. (2011) presentó porcentajes de inhibición del 57,8% (metanol), 99,9% (etil acetato), 99,8% (PDG), 42,2% (PDDG) y 35,7% (phillyrin). En los resultados obtenidos por este trabajo, el mayor porcentaje lo presentaron las hojas de ambas especies con promedios de 89,47% y 88,69%, siendo cercanos a los obtenidos por el autor. Gülçin et al. (2008) adicionalmente evaluó secoiridoides (glucósidos) aislados de la raíz del arupo blanco, obteniendo como resultados porcentajes de inhibición del 97,2% para el ligustrosido y 51,8% para la oleuropeína, mostrando mayor efectividad que antioxidantes comunes (BHT, Trolox y tocoferol), aludiendo la diferencia de inhibición entre los glucósidos al grupo hidroxilo adicional que posee el ligustrosido.

Gülçin y colaboradores en 2006 analizaron la actividad quelante de metales en iones ferrosos por parte del *Ch. virginicus* L. al inhibir la formación del complejo  $Fe^{2+}$ -ferrozina y determinaron que los extractos de metanol y etil acetato (10  $\mu$ g/mL) mostraban porcentajes de quelación del 94,5% y 88,6%; sus resultados destacaron frente BHT, BHA,  $\alpha$ -tocoferol y Trolox. De igual forma, analizaron el poder reductor del complejo  $Fe^{3+}$ /ferrocianuro (ferrocianuro de potasio) obteniendo resultados similares al  $\alpha$ -tocoferol y mayores Trolox. En este trabajo analizamos su capacidad de reducción del ion férrico mediante el ensayo FRAP, obteniendo las mejores capacidades en las hojas de ambas especies con 3,346 y 3,344 mM equivalentes de  $Fe^{2+}$  (figura 16).

Boyer et al. (2006) tras analizar extractos purificados de raíz de *Ch. virginicus* L. utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) determino la presencia de 9 compuestos: pinoresinol-4',4''-di-O- $\beta$ -D-glucósido, pinoresinol-4''-O- $\beta$ -D-glucósido, acetoxipinoresinol-4''-O- $\beta$ -D-glucósido, phillyrin-2-O- $\beta$ -D-glucósido, phillyrin-6-O- $\beta$ -D-glucósido, angustifoliosido B, oleuropeína, phillyrin y ligustrosido. Mediante el análisis estadístico de los distintos ensayos se determinó que no existe diferencia significativa en el carácter antioxidante entre las dos especies del género

*Chionanthus*, lo que nos sugeriría que en el arupo rosado participan similares moléculas que su pariente norteamericano, no obstante, sería necesario su análisis con HPLC para corroborar esta hipótesis. Holzmeyer et al. (2020) menciona que, la historia evolutiva compartida sugiere que la diversidad biológica y química podría no estar correlacionada linealmente, pues las especies estrechamente relacionadas producirían iguales metabolitos y que la similitud de metabolismo no debe confundirse con la similitud de función o bioactividad, pues un cambio estructural simple cambia sustancialmente el perfil biológico.

El contenido de fenoles y flavonoides determinado en las hojas de ambas especies concordó con su alto carácter antioxidante respecto al resto de órganos analizados (figura 21). A la fecha, no se realizó un análisis cuantitativo de este tipo de metabolitos en ninguna de las dos especies, sin embargo, Lee et al. (2019) evaluó el contenido de metabolitos en flores de *Chionanthus retusus*, representante de Asia oriental, obteniendo valores  $125,4 \pm 3,3$  mg GAE/g dw y  $119,1 \pm 2,7$  mg CA/g dw para fenoles y flavonoides, respectivamente. Si bien estos datos no nos permiten una comparación con *Ch. pubescens* y *Ch. virginicus* por su origen y metodología aplicada, los mayores contenidos transformados a peso seco (tabla 8) en flores de arupo blanco ( $75,86$  mg GAE/g dw y  $88,29$  mg QE/g dw) muestran el potencial que tienen estas dos especies frente a otro miembro representativo del género.

En el ensayo de flavonoides por el método  $AlCl_3$ , la figura 25 muestra que la reacción produjo una coloración azul con los frutos, a diferencia del característico color amarillo-parduzco. Moncada et al. (2003), Trouillas et al. (2016) y Shraim et al. (2021) mencionan que, la formación de color azul se denomina copigmentación e involucra flavonoides y metales, principalmente antocianinas con anillo B de catecol o pirogalol (derivados de cianidina, petudina y delphinidina) al interactuar con iones metálicos como  $Al^{3+}$ .

Las antocianinas son pigmentos polifenólicos (flavonoides) solubles en agua, responsable de los colores desde rojizos hasta azules/morados, normalmente encontrados en frutas, verduras y

flores. Estas moléculas funcionan en las plantas como fotoprotector, atractor de polinizadores y dispersión de semillas; cuentan con características antioxidantes atractivos a la investigación y cuantificación por sus funciones protectoras (Taghavi et al., 2022). El método diferencial de pH mostró una mayor concentración de antocianinas monoméricas en las flores del arupo rosado que en su pariente norteamericano, lo que explicaría su color. El fruto no mostro una diferencia estadística a su contenido entre las especies y su presencia se vería asociada a la necesidad de atraer dispersores (Peach et al., 2020). Las semillas del género *Chionanthus* tiene un estado de latencia exógeno/endógeno que requiere de la molleja de las aves (mirlos) en la naturaleza y tratamientos con shocks térmicos a nivel de laboratorio para su propagación, como lo menciona Chien et al. (2004) y Romero et al. (2021).

La correlación de los ensayos de carácter antioxidante y cuantificación de metabolitos mostraron relaciones positivas entre sí, a mayor capacidad antioxidante, mayor era el contenido en cada muestra. Sin embargo, la correlación variable mediante los coeficientes de Pearson corresponde la base de las pruebas y sus desventajas. DPPH al disolverse solo en medios orgánicos (alcoholes) compromete la medición de antioxidantes hidrofílicos, además, produce interferencias al interactuar con antocianinas y carotenoides al absorberse al mismo rango de longitud de onda (Sadeer et al., 2020). ABTS mide antioxidantes tanto lipófilos como hidrófilos, pero puede conducir a sobreestimaciones y subestimaciones por la termodinámica de la reacción y lentitud con ciertos antioxidantes (Platzer et al., 2021). FRAP al ser un método basado en reacciones redox, cualquier sustancia donadora de electrones con un potencial redox menor que el  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  puede contribuir en los resultados, puede subestimar la capacidad de antioxidantes con grupo tiol (-SH), carotenoides y ciertas proteínas (Echegaray et al., 2021).

EL ensayo de CAT mostró correlaciones negativas con las distintas pruebas antioxidantes. Taghavi et al. (2022) y Muzi & Hanandi (2019) señalan que, los métodos en la evaluación de antocianinas monoméricas están sujetos a interferencia de las impurezas absorbentes de luz

presentes en los extractos, el diferencial pH, temperatura y extracción por solvente en ambiente ácido, además que el metanol funciona mejor que etanol como solvente extracción. El largo tiempo del método promueve la degradación de estos metabolitos.

Barreiro (2019) menciona que, la posibilidad de encontrar nuevos fármacos y precursores de fuentes naturales es una de las razones más citadas para preservar la biodiversidad. Tras los ensayos de este trabajo, identificamos que *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L. presentan similar potencial antioxidante y contenido de metabolitos, volviendo al arupo rosado una posible fuente de compuestos bioactivos como su pariente norteamericano. En la actualidad, la tintura del arupo blanco es comercializada y utilizada como remedio en el tratamiento de hepatitis, ictericia, dolor de cabeza, fatiga corporal, estimulación del apetito y estimulante de la digestión Clarke (1902) y Boyer et al. (2011).

De igual forma, se ha visto que las plantas pertenecientes a este género, tales como *Chionanthus retusus*, son reconocidas por tener un gran contenido de flavonoides, lignanos, esteroides y terpenoides, mostrando eficacia en la medicina oriental como antipirético, antitumoral, antiinflamatorio, neuroprotector y antioxidante, antiviral, en el tratamiento de parálisis y trastornos estomacales (Lee et al., 2019). Wang et al. (2022) menciona que *Ch. retusus*, al igual que el resto de miembros del género, es usado en América del Norte como planta ornamental, porta injertos y sus hojas consideradas como una gran cantidad de biomasa desechable, pero como se ha visto en su trabajo y este, pueden ser fuentes prometedoras para su uso en medicamentos, suplementos dietéticos y cosméticos.

Finalmente, hay que considerar que la selección de fuentes naturales para nuevos metabolitos biológicamente activos ha sido una parte esencial en los programas de descubrimiento de fármacos y el descubrimiento de nuevas propiedades ha impulsado la diversificación de sus aplicaciones (Dincheva et al., 2023). Estos productos naturales poseen estructuras químicas diversas y complejas que parecen exhibir mayor compatibilidad biológica y similitud funcional que los

derivados de fuentes puramente sintéticas, siendo mejores candidatos para el desarrollo de medicamentos y su uso en la industria alimenticia (Najmi et al., 2022).

## Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

### Conclusiones

Se recolectaron muestras de los distintos órganos vegetales (hojas, flores y frutos) en estado maduro de las dos especies evaluadas del género *Chionanthus* (*Ch. pubescens* Kunth y *Ch. virginicus* Linneo) y se obtuvieron sus extractos etanólicos.

Se determinó que el mejor carácter antioxidante lo presentaron las hojas de *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L. frente al resto de muestras, con porcentajes de inhibición de radicales libres de 73,15% y 71,88% en el ensayo DPPH, 89,45% y 88,69% para el ensayo ABTS, y para el ensayo FRAP un potencial reductor de 3,346 mM y 3,344 mM equivalentes de Fe<sup>2+</sup>, respectivamente.

El contenido total de fenoles y flavonoides concordaron con los resultados del carácter antioxidante, las hojas de *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L. mostraron las mayores concentraciones con valores de 2845,55 mg GAE/100 g fw y 2386,17 mg GAE/100 g fw para fenoles, y para flavonoides 60,758 mg QE/g fw y 67,242 mg QE/g fw, respectivamente.

El contenido total de antocianinas determinó una mayor concentración en flores de *Ch. pubescens* K. con una concentración de 9,332 mg cianidina-3-glucósido/L, seguido de los frutos de ambas especies con 6,668 mg cianidina-3-glucósido/L (ARFr) y 5,900 mg cianidina-3-glucósido/L (ABFr) y la menor concentración en las flores blancas de *Ch. virginicus* L. con 3,827 mg cianidina-3-glucósido/L.

La comparación del carácter antioxidante y contenido metabólico (fenoles, flavonoides y antocianinas) entre ambas especies del género *Chionanthus* determinó que no hubo diferencia significativa entre muestras, a excepción del contenido de antocianinas respecto a las flores siendo las del arupo rosado el mayor valor obtenido.

Se determinó que *Ch. pubescens* K. es una posible fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes que podrían aprovecharse como las de su pariente norteamericano (*Ch. virginicus* L.) y de Asia oriental (*Ch. retusus*).

### **Recomendaciones**

Para posteriores evaluaciones, identificar ejemplares en iguales estadíos para la recolección de muestras, especialmente para el fruto donde se evidencio mayor diferencia de temporada en su fructificación y maduración.

Realizar un análisis de distintas muestras (hojas, flores, fruto, corteza y corteza de raíz) empleando metanol por su mayor eficiencia de extracción y su posterior tratamiento con el fin de hacer una mejor comparación frente a la bibliografía existente.

Para el análisis de antocianinas, aplicar la extracción con metanol en un ambiente ácido (HCl) para una mayor recuperación y evitar la degradación del pigmento. Utilizar cloroformo para la eliminación de impurezas (carotenoides y clorofilas) absorbentes de luz que interviene durante la evaluación, separando los componentes solubles en agua y lípidos de los extractos.

Aplicar el método HPLC-MS para la identificación de los componentes presentes en *Ch. pubescens* K. para comparar con los descritos en bibliografía de *Ch. virginicus* L. y *Ch. retusus*.

### Bibliografía

- Ahmadi, K., Omid, H., Mehrnia, M., & Rehman, H. U. (2019). *Comparative Extraction Efficacy of Different Organic Solvents for Leaf Chlorophylls and Carotenoids in (Portulaca oleracea L.) Varying with Growth Behavior and Stress Type* (N.º 2019090152). Preprints.  
<https://doi.org/10.20944/preprints201909.0152.v1>
- Aleaga, N. (2014). *Caracterización Fitoquímica y Actividad Biológica de Oryctanthus spicatus (Loranthaceae)* [Universidad Politécnica Salesiana].  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7084/1/UPS-QT05854.pdf>
- Ammar, H., Touhri, I., Kholif, A. E., M'Rabet, Y., Jaouadi, R., Chahine, M., Marti, M. E. de H., Vargas-Bello-Pérez, E., & Hosni, K. (2022). Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Leaves of Ajuga Iva. *Molecules*, 27(20), Art. 20.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27207102>
- Armijos, C., Ramírez, J., Salinas, M., Vidari, G., & Suárez, A. I. (2021). Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals*, 14(11), Art. 11. <https://doi.org/10.3390/ph14111145>
- Atta, E., Mohamed, N., & Abdelgawad, A. (2017). Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types. *European Chemical Bulletin*, 6, 365-375.  
<https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375>
- Augustyniak, A., Bartosz, G., Čipak, A., Duburs, G., Horáková, L., Łuczaj, W., Majekova, M., Odysseos, A. D., Rackova, L., Skrzydlewska, E., Stefek, M., Štrosová, M., Tirzitis, G., Venskutonis, P. R., Viskupicova, J., Vraka, P. S., & Žarković, N. (2010). Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radical Research*, 44(10), 1216-1262.  
<https://doi.org/10.3109/10715762.2010.508495>
- Balseca, R. (2017). Screening fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de: Catharanthus Roseus (L.) G, Don, Justicia Pectoralis Jacq. Y Scoparia Dulcis L. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(3), 68-78. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.58>

- Barragán, M., Delgado, M. del C., Carrasco, E., Quispe, U. S., Barragán-Condori, M., Delgado, M. del C., Carrasco, E., & Quispe, U. S. (2021). Anthocyanins and antioxidant capacity in *Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer dried and frozen fruit extracts. *Información tecnológica*, 32(5), 3-12. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642021000500003>
- Barreiro, E. J. (2019). What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 91. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190306>
- Barua, C. C., Sen, S., Das, A., Talukdar, A., Hazarika, N., Barua, A., Baruah, D., & Barua, I. (2014). A comparative study of the in vitro antioxidant property of different extracts of *Acorus calamus* Linn. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4, 8-18.
- Borges, A., José, H., Homem, V., & Simões, M. (2020). Comparison of Techniques and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. *Antibiotics*, 9(2), 48. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020048>
- Boyer, L., Baghdikian, B., Bun, S.-S., Taoubi, K., Diaz-Lanza, A., Elias, R., & Ollivier, E. (2011). *Chionanthus Virginicus* L.: Phytochemical Analysis and Quality Control of Herbal Drug and Herbal Preparations. *Natural Product Communications*, 6(6), 1934578X1100600603. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600603>
- Boyer, L., Elias, R., Taoubi, K., Debrauwer, L., Faure, R., Baghdikian, B., & Balansard, G. (2006). Lignans and secoiridoids from the root bark of *Chionanthus virginicus* L.: Isolation, identification and HPLC analysis. *Phytochemical Analysis*, 16(5), 375-379. <https://doi.org/10.1002/pca.863>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales* (2.ª ed.). Editorial Acribia, S.A. [https://www.editorialacribia.com/libro/farmacognosia-fitoquimica-plantas-medicinales\\_54366/](https://www.editorialacribia.com/libro/farmacognosia-fitoquimica-plantas-medicinales_54366/), [https://www.editorialacribia.com/libro/farmacognosia-fitoquimica-plantas-medicinales\\_54366/](https://www.editorialacribia.com/libro/farmacognosia-fitoquimica-plantas-medicinales_54366/)

- Cacique, A. P., Barbosa, É. S., Pinho, G. P. de, & Silvério, F. O. (2020). Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia*, 44.  
<https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420>
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A., Oliveira, M., & Ferreira, I. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342-346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.075>
- Chaves, N., Santiago, A., & Alías, J. C. (2020). Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>
- Checa, X., & Grijalva, J. (2012). *El Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo*. Informe Nacional Ecuador. <http://www.fao.org/3/i3825e/i3825e20.pdf>
- Chien, C.-T., Kuo-Huang, L.-L., Shen, Y.-C., Zhang, R., Chen, S.-Y., Yang, J.-C., & Pharis, R. P. (2004). Storage Behavior of *Chionanthus retusus* Seed and Asynchronous Development of the Radicle and Shoot Apex during Germination in Relation to Germination Inhibitors, Including Abscisic Acid and Four Phenolic Glucosides. *Plant and Cell Physiology*, 45(9), 1158-1167.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pch129>
- Christenhusz, M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), Art. 3. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Clarke, J. (1902). *Materia Médica—Homeopatía*. *Chionanthus virginica*.  
<https://www.materiamedica.info/en/materia-medica/john-henry-clarke/chionanthus-virginica>
- Córdova, S. V. (2018). *Evaluación del efecto de la aplicación del fertilizante en las plantas de Chionanthus pubescens K. (Arupo), parroquia La Península, cantón Ambato, provincia de Tungurahua*. <http://dspace.epoch.edu.ec/handle/123456789/8732>

- Corlett, R. T. (2016). Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. *Plant Diversity*, 38(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>
- Dincheva, I., Badjakov, I., & Galunska, B. (2023). New Insights into the Research of Bioactive Compounds from Plant Origins with Nutraceutical and Pharmaceutical Potential. *Plants*, 12(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/plants12020258>
- Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Chabani, Z., Farag, M. A., & Domínguez, R. (2021). Measurement of Antioxidant Capacity of Meat and Meat Products: Methods and Applications. *Molecules*, 26(13), Art. 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26133880>
- Egbuna, C., Ifemeje, J., Kryeziu, T., Mukherjee, M., Shah, H., Narasimha Rao, G., Gido, L., & Tijjani, H. (2018). *Introduction to Phytochemistry* (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 1, pp. 1-29). Apple Academic Press/CRC Press, Taylor & Francis. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18812.23687>
- Espadero, S. (2018). *Comparación de la capacidad antioxidante de cuatro metabolitos secundarios presentes en Taraxacum officinale (Diente de León) frente a N-Acetil cisteína un antioxidante comercial* [Trabajo de titulación, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16225/1/UPS-CT007881.pdf>
- Fernández, J. L., & Cogollo, Á. (2017). Sinopsis de Chionanthus (Oleaceae) en Colombia y países limítrofes y descripción de una nueva especie. *Real Jardín Botánico CSIC*, 74(1), 1-2. <https://doi.org/10.13039/501100003329>
- Fernández, S., Villaño, D., Troncoso, A., & García, C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110-122.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., & Boyer, L. (2006). Antioxidant activity of lignans from fringe tree (Chionanthus virginicus L.). *European Food Research and Technology*, 223(6), 759. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0265-5>

- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., & Köksal, E. (2008). Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Science and Technology*, 43(3), 195.  
<https://doi.org/10.1007/s00226-008-0234-1>
- Gülçin, Ý., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., & Köksal, E. (2007). A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6(4), Art. 4. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i4.56230>
- Haruna, A., & Yahaya, S. M. (2021). Recent Advances in the Chemistry of Bioactive Compounds from Plants and Soil Microbes: A Review. *Chemistry Africa*, 4(2), 231-248.  
<https://doi.org/10.1007/s42250-020-00213-9>
- Hassan, A., Akmal, Z., & Khan, N. (2020). The Phytochemical Screening and Antioxidants Potential of *Schoenoplectus triqueter* L. Palla. *Journal of Chemistry*, 2020, e3865139.  
<https://doi.org/10.1155/2020/3865139>
- Holzmeyer, L., Hartig, A.-K., Franke, K., Brandt, W., Muellner-Riehl, A. N., Wessjohann, L. A., & Schnitzler, J. (2020). Evaluation of plant sources for antiinfective lead compound discovery by correlating phylogenetic, spatial, and bioactivity data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12444-12451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915277117>
- Hussein, R. A., El-Anssary, A. A., Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2018). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. En *Herbal Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Idrobo, L. L. (2003). *El verdor de los Andes Ecuatorianos: Realidades y promesas*. Proyecto Desarrollo Forestal Participativo en los Andes.
- Iqbal, E., Salim, K. A., & Lim, L. B. L. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University - Science*, 27(3), 224-232.  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2015.02.003>

- Iser, M., Valdivié, M., Figueredo, L., Nuñez, E., Más, D., Martínez, Y., Iser, M., Valdivié, M., Figueredo, L., Nuñez, E., Más, D., & Martínez, Y. (2020). Metabolitos secundarios, indicadores de calidad y características organolépticas de la harina de tallos de *Agave fourcroydes* (Henequén). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1), 25-34.
- Kapadia, P., Newell, A. S., Cunningham, J., Roberts, M. R., & Hardy, J. G. (2022). Extraction of High-Value Chemicals from Plants for Technical and Medical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), Art. 18. <https://doi.org/10.3390/ijms231810334>
- Lee, Y.-G., Lee, H., Jung, J.-W., Seo, K.-H., Lee, D. Y., Kim, H.-G., Ko, J.-H., Lee, D.-S., & Baek, N.-I. (2019). Flavonoids from *Chionanthus retusus* (Oleaceae) Flowers and Their Protective Effects against Glutamate-Induced Cell Toxicity in HT22 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), Art. 14. <https://doi.org/10.3390/ijms20143517>
- Litescu, S. C., Eremia, S., & Radu, G. L. (2010). Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698, 241-249. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_18)
- López, V. (2007). *Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional Navarra*. <https://dadun.unav.edu/handle/10171/20052>
- Malta, L. G., & Liu, R. H. (2014). Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. En N. K. Van Alfen (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 305-314). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00058-9>
- Mfotie, E. (2021). Chapter 31—Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. En V. R. Preedy & V. B. Patel (Eds.), *Cancer (Second Edition)* (pp. 349-357). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819547-5.00031-6>
- Moncada, M. C., Moura, S., Melo, M. J., Roque, A., Lodeiro, C., & Pina, F. (2003). Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts: A source for blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 51-61. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00394-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00394-3)

- Murugan, R., & Parimelazhagan, T. (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An in vitro approach. *Journal of King Saud University - Science*, 26(4), 267-275.  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.09.006>
- Muzi, A., & Hanandi, K. (2019). The analysis of monomeric anthocyanin by pH differential method is not appropriate for certain anthocyanins. *Outlook and Opportunities of Food Technology and Culinary for Tourism Industry*, 26-30. <https://doi.org/10.5220/0009985400002964>
- Najmi, A., Javed, S. A., Al Bratty, M., & Alhazmi, H. A. (2022). Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. *Molecules*, 27(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/molecules27020349>
- Nettleton, D. (2014). Chapter 6—Selection of Variables and Factor Derivation. En D. Nettleton (Ed.), *Commercial Data Mining* (pp. 79-104). Morgan Kaufmann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416602-8.00006-6>
- Owens, F. (2018, abril 27). *White Fringetree (Chionanthus virginicus)*. iNaturalist United Kingdom; iNaturalist United Kingdom. <https://uk.inaturalist.org/observations/11517064>
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., & Cheng, Y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.621276>
- Paz, D. (2022, noviembre 2). *Chionanthus pubescens*. iNaturalist United Kingdom; iNaturalist United Kingdom. <https://uk.inaturalist.org/observations/140885594>
- Peach, K., Liu, J. W., & Mazer, S. J. (2020). Climate Predicts UV Floral Pattern Size, Anthocyanin Concentration, and Pollen Performance in *Clarkia unguiculata*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 847. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00847>
- Penman, K. G., Bone, K. M., & Lehmann, R. P. (2008). Fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) stem bark offers a sustainable alternative to root bark. *Australian Journal of Medical Herbalism*, 20(3), 107-112.

- Peralta, E. (2017). *El arupo (Chionanthus pubescens Kunth), árbol ornamental con potencial de uso en Ecuador*. IDEAZ. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4298>
- Pisoschi, A., & Negulescu, G. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., Miesbauer, O., & Eisner, P. (2021). Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules*, 26(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/molecules26051244>
- Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629-642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Quishpe, J. A. (2011). *Evaluación de seis tratamientos pre germinativos y cuatro tipos de Sustratos para la preparación de Arupo (Chionanthus pubescens Kunt)*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/708>
- Romero, M. J. A., Mediavilla, B. S. H., & Pantoja, M. I. V. (2021). Pre-germinative treatments applied to *Chionanthus pubescens* and *C. virginicus* seeds for sexual propagation. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 51. <https://www.redalyc.org/journal/2530/253068585009/html/>
- Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

- San Miguel, A., & Martin, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, *106*(3), 106-113.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(09\)74661-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(09)74661-X)
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, *150*, 111932.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Suarsana, I. N., Utama, I. H., Arjentina, I. P. G. Y., & Kardena, I. M. (2018). Potential inhibition of glycation and free radical scavenging activities of purple sweet potato extracts. *Bioscience Journal*, *34*(6), Art. 6. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n6a2018-42703>
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., & Zhang, H. (2015). Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, e595393. <https://doi.org/10.1155/2015/595393>
- Swallah, M. S., Sun, H., Affoh, R., Fu, H., & Yu, H. (2020). Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *International Journal of Food Science*, *2020*, e9081686. <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>
- Taghavi, T., Patel, H., & Rafie, R. (2022). Comparing pH differential and methanol-based methods for anthocyanin assessments of strawberries. *Food Science & Nutrition*, *10*(7), 2123-2131.  
<https://doi.org/10.1002/fsn3.2065>
- Tar, K. Y. K., Naing, A. H., Ai, T. N., Chung, M. Y., & Kim, C. K. (2018). Optimization of factors influencing in vitro immature seed germination in *Chionanthus retusus*. *Journal of Plant Biotechnology*, *45*(4), 347-356. <https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.4.347>
- Trouillas, P., Sancho, J., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment | Chemical Reviews. *ACS Publications*, *116*(9), 4937-4982.

- Uzombah, T. A. (2022). The Implications of Replacing Synthetic Antioxidants with Natural Ones in the Food Systems. En *Natural Food Additives*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.103810>
- Valencia, E., Figueroa, I., Sosa, E., Bartolomé, E., Martínez, H., & García, M. (2016). Polifenoles: Propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 16(1), 15-30.
- Venkateswara, R., Raju, A., & Kammakshamma, J. (2013). Phytochemical screening and antioxidant activity of bark extracts of *Chionanthus zeylanica* linn., as an important medicinal plant in eastern ghats. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(2).  
<https://www.ijddr.in/abstract/phytochemical-screening-and-antioxidant-activity-of-bark-extracts-of-rnchionanthus-zeylanica-linn-as-an-important-medicinal-plant-in-eastern-ghats-6876.html>
- Verpoorte, R., Kim, H. K., & Choi, Y. H. (2022). Trivialities in metabolomics: Artifacts in extraction and analysis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.972190>
- Wadl, P. A., Rinehart, T. A., Olsen, R. T., Waldo, B. D., & Kirkbride, J. H. (2022). Genetic Diversity and Population Structure of *Chionanthus virginicus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 147(1), 62-69. <https://doi.org/10.21273/JASHS05095-21>
- Walton, Z. (2022). *Chionanthus retusus* (Chinese Fringetree, Chinese Fringe Tree) [North Carolina Extension]. Gardener Plant Toolbox. <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/chionanthus-retusus/>
- Wang, Z., Yang, S., Gao, Y., & Huang, J. (2022). Extraction and purification of antioxidative flavonoids from *Chionanthus retusa* leaf. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.1085562>
- Žuntar, I., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Nutrizio, M., Šupljika, F., Poljanec, A., Dubrović, I., Barba, F. J., & Režek Jambrak, A. (2019). Phenolic and Antioxidant Analysis of Olive Leaves Extracts

(*Olea europaea* L.) Obtained by High Voltage Electrical Discharges (HVED). *Foods*, 8(7), Art. 7.

<https://doi.org/10.3390/foods8070248>

## Apéndices