

# ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS Y FRUTOS DE *Cavendishia nitida* (Kunth) A. C. Sm Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

<sup>1</sup>Jorge Andrés Carvajal Vásquez.

<sup>1</sup>Estudiante de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. j\_carvajal@javeriana.edu.co.

## RESUMEN.

*Cavendishia nitida* (Kunth) A. C. Sm es un arbusto terrestre de 1 a 3 metros de altura, con tallo erecto y glabro. Se le conoce como “Uva camarona”, “uvo”, o “uva”. Es una planta endémica para Colombia, es posible encontrarla entre 1300 y 3000 msnm, en las Cordilleras Central y Oriental. En Colombia, los frutos son aprovechados como alimento por habitantes del altiplano cundiboyacense. Si bien Colombia cuenta con numerosas especies del género *Cavendishia* hay un vacío considerable de información con respecto a la química de estas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento químico de una especie de la familia Ericaceae endémica de Colombia (*Cavendishia nitida* (Kunth) A. C. Sm.), así como determinar su actividad antioxidante, con el fin de tener información que permita incentivar su potencial aprovechamiento. Para llevarlo a cabo, se colectaron hojas y frutos, posteriormente se prepararon extractos etanólico y metanólico de cada uno respectivamente. Luego, el extracto total de hojas fue fraccionado y subfraccionado mediante cromatografía en columna por gravedad. Por último, se realizó la elucidación estructural de los compuestos, usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Por otra parte, se determinó la actividad antioxidante del extracto total de hojas, la subfracción de Acetato de Etilo y la de Butanol junto con el extracto total de Frutos, mediante la capacidad captadora de radicales ABTS y DPPH. Finalmente de estos extractos y fracciones, se cuantificó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y antocianinas; mediante el método de Folin – Ciocalteu, Tricloruro de Aluminio e interpolación externa en HPLC – DAD, respectivamente. Se reporta la presencia de cuatro compuestos: Rimueno, Kaur-16-eno,  $\alpha$  – amirina y  $\beta$  – amirina, por primera vez para esta especie. Adicionalmente, se encontró que de las fracciones obtenidas la que cuenta con mayor actividad antioxidante es la de Acetato de Etilo. Por otro lado, hay un mayor contenido de fenoles totales y flavonoides totales en el extracto total de hojas y las subfracciones analizadas. Finalmente, se encontró también que el extracto total de frutos es el que cuenta con un mayor contenido de antocianinas.

## INTRODUCCIÓN

*Cavendishia nitida* (Kunth) A. C. Sm es un arbusto terrestre de 1 a 3 metros de altura, con tallo erecto y glabro. Tiene hojas alternas, coriáceas, de ápice acuminado y con apariencia lustrosa. En el haz, las hojas son color verde oscuro brillante, mientras que en el envés son verdes con un tinte rojizo. Sus frutos son bayas, de 7 a 9 mm de largo, con 8 mm de diámetro, rojos. Se le conoce como “Uva camarona”, “uvo”, o “uva” (Abril Ramírez, 2010) Es una planta endémica para Colombia, es posible encontrarla entre 1300 y 3000 msnm, en las Cordilleras Central y Oriental (Celis, Gradstein, & Bernal, 2016; Luteyn, J., 1983) En Colombia, los frutos son aprovechados como alimento por habitantes del altiplano cundiboyacense (Abril Ramírez, 2010)

Para el género *Cavendishia* los metabolitos más abundantes reportados son del tipo estilbenos, flavonas glicosiladas, flavonoides, flavonoles, proantocianidinas y terpenos (Dastmalchi et al., 2011; García Barriga, 1992; Luteyn, Harborne, & Williams, 1980). Específicamente para las hojas de *C. nitida* se ha reportado quercetina, miricetina, y algunos estilbenos (Luteyn, Harborne, & Williams, 1980) Mientras que, para sus frutos según la literatura consultada en bases de datos indexadas, no se encontraron estudios químicos.

Si bien Colombia cuenta con 69 especies del género *Cavendishia* (Bernal et al, 2019), existe un vacío considerable de información con respecto a la química de estas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento químico de una especie de la familia Ericaceae endémica de Colombia (*Cavendishia nitida* (Kunth) A. C. Sm.), así como determinar su actividad antioxidante, con el fin de tener información que permita incentivar su potencial aprovechamiento.

## **METODOLOGÍA**

El material vegetal (hojas y frutos) fue colectado en el páramo El Tablazo, en la cercanía al municipio de Subachoque, Cundinamarca, Colombia [5° 00' 37" N 74° 11' 34" W] a 2900 msnm. Un ejemplar fue enviado al herbario de la Pontificia Universidad Javeriana para su determinación taxonómica, bajo el código N.García 764. Se colectaron 2 kg de hojas de la planta, las cuales se secaron en horno a 40 °C y se trituraron antes de la extracción con solventes. Por otro lado, se colectaron 42,60 g de frutos, los cuales se congelaron a -80 °C, posteriormente se liofilizaron y finalmente se almacenaron a -80 °C. La colecta del material se hizo amparada en el contrato marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus productos derivados No. 212 del 19 de julio de 2018, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Pontificia Universidad Javeriana.

### **Obtención de extractos de hojas y frutos de *C. nitida***

Las hojas secas y molidas se extrajeron con etanol, mediante maceración a temperatura ambiente durante dos meses. El extracto etanólico obtenido (EHetOHCn; 112,20 g) fue floculado con agua y acetona en relación 2 : 1 v : v y filtrado posteriormente.

Para los frutos se realizó la extracción asistida por ultrasonido de 2,5 g de material liofilizado obteniéndose 1,20 g de extracto (EFMeOHCn). Los extractos EHetOHCn y EFMeOHCn se sometieron a pruebas químicas preliminares para reconocer los grupos de metabolitos presentes (Bilbao Rodríguez, 1997).

### **Materiales y equipos**

Los análisis por cromatografía de masas acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se realizaron en un equipo Agilent Technologies modelo 7890AGC acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 con analizador cuadrupolo, ionización electrónica (IE) a 70 eV en modo *full scan* a 4,75 *scan s*<sup>-1</sup>, en el rango de masas m/z 20-300uma. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida, Rtx-5MS de 30 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 μm (df), con fase estacionaria 5% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80 °C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (10min) @ 10°C/min. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285 °C, respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1 mL/min. El reconocimiento de los

componentes presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros de masas adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos Willey8 y NIST08. Se realizó una semicuantificación de los compuestos con base en los porcentajes de área relativa de cada pico reportada en los cromatogramas.

El análisis por UHPLC-DAD se realizó en un equipo Shimadzu Prominence Nexera -I con un detector de arreglo de diodos (DAD) SPD M20A, columna Phenomenex Kinetex® C18 (100 mm x 2,1 mm d.i. x 2,6 µm tamaño de partícula).

Los disolventes empleados en las extracciones, particiones y eluciones cromatográficas fueron de grado analítico. Para los análisis por UHPLC se utilizaron disolventes grado espectroscópico, las muestras disueltas en los respectivos solventes se filtraron en filtros Millipore 0,2 µm PTFE.

Para las separaciones por cromatografías en columna (CC) se utilizaron fases estacionarias de sílica gel 60 con tamaño de partículas de 63-120 µm (separaciones por gravedad). Las cromatografías en capa delgada (TLC) se realizaron en cromatoplasmas de sílica gel 60 HF254 o RP-18 de 0,2 mm de espesor. Se emplearon reveladores como luz UV (254 y/o 366 nm), vapores de yodo, reactivo NP-PEG y vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seguido de calentamiento.

Los patrones de antocianinas fueron obtenidos en Sigma Aldrich Canada y PhytoLab.

### **Fraccionamiento del extracto de hojas de *C. nitida* (EHetOHCn)**

Se tomaron 84 g de EHetOHCn para fraccionarlo mediante extracción líquido - líquido continua con solventes de polaridad creciente, obteniéndose un total de 5 fracciones: Fracción de Hexano (FrHex; 2,22 g), Diclorometano (FrDCM; 4,73 g), Acetato de Etilo (FrAcOEt; 17,10 g), Butanol (FrBu; 15,00 g) y un residuo acuoso (FrAc; 70,56 g).

Para la selección de las fracciones a subfraccionar se realizó un monitoreo en TLC utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 HF254, y como fase móvil Hexano : Acetato de Etilo (7:3). Las fracciones se escogían de acuerdo con su peso y a la complejidad observada en la TLC.

Por otro lado, 2,22 g de FrHex se fraccionaron por Cromatografía en Columna (CC) fase móvil Hexano : Acetato de Etilo (7:3) obteniendo 7 fracciones (FrHex1 – 7). FrHex-1 se observó como una mezcla amarilla viscosa y fue analizada por GC-MS. Por otro lado, se subfraccionó FrHex2 utilizando como fase móvil Hexano : Acetato de Etilo (0 – 100%), obteniendo 6 subfracciones (FrHex2.1 – 2.6). A partir de FrHex2.5 se obtuvo 0,1380 mg de un sólido blanco denominado Cn1 que fue analizado por GC-MS.

En cuanto a la FrDCM, se fraccionaron 3 g mediante CC, empleando como fase móvil Diclorometano: Acetato de Etilo (7:3) obteniendo 8 fracciones (FrDCM1 – 8). La FrDCM4 fue fraccionada utilizando como fase móvil Cloroformo y Acetato de Etilo (0 – 100%), obteniendo 5 fracciones (FrDCM4.1 – 4.5).

Las Fracciones FrAc, FrBu y FrAcOEt no fueron subfraccionadas debido a su alta polaridad. Sin embargo, FrBu y FrAcOEt fueron monitoreadas por Cromatografía en Capa Delgada (TLC) en placas de fase estacionaria RP18, usando como fase móvil Metanol : Agua (8:2) y revelador NP-PEG, visualizadas con lámpara UV a 366 nm.

## **Cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y antocianinas**

En la TLC para FrBu y FrAcOEt y revelada con NP-PEG, se observaron fluorescencias típicas de metabolitos de tipo flavonoide, por lo tanto, se decidió hacer la cuantificación de dichos compuestos. De igual manera también fueron cuantificados en los extractos EHEtOHCn y EFMeOHCn.

### **Cuantificación de fenoles totales**

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu (Ainsworth & Gillespie, 2007; Llivisaca et al., 2018; Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011). Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de extracto o fracción (2,5 mg/mL), se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin - Ciocalteu (10% v/v) y luego de 5 minutos, se añadió 1600  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,4% m/v) transcurrido este tiempo se mantuvo en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm. El contenido de fenoles totales se determinó por interpolación en una curva de calibración utilizando como patrón ácido gálico, los resultados se expresaron en términos de mg Eq de Ácido Gálico/ g de Extracto Seco.

### **Cuantificación de flavonoides totales**

La cuantificación de flavonoides totales se realizó por el método de  $\text{AlCl}_3$  (Orduz, 2017; Woisky & Salatino, 1998). Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto o fracción (2,5 mg/mL), se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  2 % m/v, 150  $\mu\text{L}$  de HCl 1M y 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1M. Posteriormente se adicionaron 850  $\mu\text{L}$  de metanol y se mantuvo en reposo, en oscuridad y a temperatura ambiente por 40 minutos y se midió la absorbancia a 425 nm. El contenido de flavonoides totales se determinó por interpolación en una curva de calibración utilizando como patrón Quercetina, los resultados se expresaron en términos de mg Eq de Quercetina / g de Extracto Seco.

### **Cuantificación de antocianinas**

La cuantificación de antocianinas se hizo mediante UHPLC-DAD a través de calibración externa interpolando las intensidades de las áreas de cada extracto o fracción en la curva de calibración. Para esto, se siguió el método de Brown & Shipley (2011) con modificaciones: Los autores utilizaron 5 patrones los cuales fueron 3-O-galactósido de cianidina, 3-O-glucósido de cianidina, 3-O-arabinósido de cianidina, 3-O-galactósido de peonidina y 3-O-arabinósido de cianidina; mientras que en el presente estudio se usaron 7: 3-O-glucósido de peonidina (P3Gl), 3-O-glucósido de cianidina (C3Gl), 3-O-glucósido de petunidina (Pe3Gl), 3-O-glucósido de malvidina (M3Gl), 3-O-galactósido de cianidina (C3Ga), y 3-O-arabinósido de cianidina (C3Ar). Las concentraciones de los patrones se pueden observar en la Tabla 1.

Se empleó una columna Phenomenex Kinetex® C18 (100 mm x 2,1 mm d.i. x 2,6  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula) a una temperatura de 40 °C. Las fases móviles fueron (A) ácido fórmico acuoso (2%) y (B) acetonitrilo - ácido fórmico acuoso (1%), los solventes utilizados fueron grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania). Para la separación se empleó un gradiente de ACN/HCOOH iniciando con 5 - 11% B por 4,17 minutos, 11 - 18% B por 9,58 minutos, 18 - 35% por 0,42 minutos, y finalmente 35 - 5% B por 2 minutos. El volumen de inyección y la tasa de flujo fueron de 3  $\mu\text{L}$  y 0,5 mL/min y la detección se hizo a 520 nm. Por cada extracto, o fracción, se pesaron 250 mg en 20 mL de metanol, de los cuales se tomó 1 mL previamente filtrado.

**Tabla 1. Concentraciones individuales de los patrones utilizados en cada dilución de la curva de calibración.**

Solución de la curva de calibración.	Concentración de patrón (µg/mL)					
	C3Ga	C3GI	C3Ar	P3GI	M3GI	Pe3GI
C1	44,00	11,00	44,00	7,70	44,00	44,00
C2	22,00	5,50	22,00	3,85	22,00	22,00
C3	11,00	2,75	11,00	1,92	11,00	11,00
C4	5,50	1,37	5,50	0,96	5,50	5,50
C5	2,75	0,69	2,75	0,48	2,75	2,75
C6	1,37	0,34	1,37	0,24	1,37	1,37
C7	0,69	0,17	0,69	0,12	0,69	0,69

#### **Actividad antioxidante de hojas y frutos de *C. nitida***

Como se mencionó previamente, la TLC para FrBu y FrAcOEt revelada con NP-PEG mostró la presencia de metabolitos de tipo flavonoide. Estos compuestos gracias a su estructura cuentan con actividad antioxidante (Havsteen, 2002), por lo cual se escogieron estas fracciones y los extractos EHEtOHCn y EFMeOHCn para cuantificar dicha actividad.

#### **Capacidad captadora de Radicales DPPH**

El ensayo fue realizado en un lector de placas FLUOStar Omega (BMG Labtech). Se solubilizaron 10 mg de radical DPPH en 10 mL de metanol y se preparó una solución de trabajo hasta obtener una absorbancia de  $0,7 \pm 0,05$  a una longitud de onda de 520 nm. Para cada extracto evaluado se prepararon concentraciones en pozo de 4, 10, 20, 30, y 40 µg/mL, en metanol. En cada pozo se adicionó 240 µL de solución de trabajo de DPPH y 10 µL de muestra. Como control negativo se utilizó metanol, y como positivo se utilizó Trolox en concentraciones de 0 a 10 mg/L. Para todas las concentraciones de las muestras y el control, la determinación se hizo por triplicado. La medición se realizó durante 30 minutos, con lecturas cada 3 minutos (Giraldo Vásquez & Ramírez Aristizabal, 2013; Guija-Poma, Inocente-Camones, Ponce-Pardo, & Zarzosa-Norabuena, 2015; Nuengchamngong & Ingkaninan, 2017; Wootton-Beard et al., 2011)

Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición (% Inh) y Concentración Inhibitoria Media (IC<sub>50</sub>). Para calcular el porcentaje de inhibición (% Inh) se utilizó la siguiente ecuación tomada de Dastmalchi et al, (2011):

$$\% Inh = \frac{A_0 - A_x}{A_0} * 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Dónde:

- A<sub>x</sub>: Absorbancia al tiempo *t* luego de agregar la alícuota de la muestra o control.

- $A_0$ : Absorbancia del blanco.

### Capacidad captadora de Radicales ABTS<sup>+</sup>

El ensayo fue realizado en un lector de placas FLUOStar Omega (BMG Labtech). Inicialmente se solubilizaron 20 mg de radical ABTS<sup>+</sup> en 10 mL de metanol, luego se adicionaron 2 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> dejándolo reaccionar durante 16 horas. Posteriormente, se preparó la solución de trabajo hasta obtener una absorbancia de  $0,7 \pm 0,05$  a una longitud de onda de 740 nm. Para cada extracto evaluado se prepararon concentraciones en pozo de 4, 10, 20, 30, y 40  $\mu\text{g/mL}$  en metanol. En cada pozo, se adicionó 240  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de ABTS, y 10  $\mu\text{L}$  de muestra. Como control negativo se utilizó metanol, y como positivo se utilizó Trolox en concentraciones de 0 a 10 mg/L. Para todas las concentraciones de las muestras, y del control, la determinación se hizo por triplicado (Garzón, Narváez, Riedl, & Schwartz, 2010; Giraldo Vásquez & Ramírez Aristizabal, 2013; Llivisaca et al., 2018; Wootton-Beard et al., 2011). La medición se realizó durante 45 minutos, con lecturas cada tres minutos. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición y Concentración Inhibitoria Media (IC<sub>50</sub>). Para calcular el porcentaje de inhibición (% Inh) se utilizó la **Ecuación 1**.

### Análisis Estadístico

Inicialmente se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con el fin de determinar qué prueba de correlación es la más apta para usar. Se realizó una prueba de correlación de Pearson. Los análisis se hicieron en el programa RStudio Versión 1.2.1335, utilizando el paquete corTest.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Pruebas químicas preliminares.

En la Tabla 2 se puede observar que los extractos de hojas y frutos presentan metabolitos del tipo terpenos, saponinas, glucósidos de flavonoides o de terpenos, leucoantocianidinas, taninos y flavonoides. Lo anterior concuerda con información previa encontrada en la literatura para la familia Ericaceae y el género *Cavendishia* (Dampc & Luczkiewicz, 2013; Dastmalchi et al., 2011; Lhuillier et al., 2007; Luteyn et al., 1980; Vasco Zamudio et al., 2019)

**Tabla 2. Resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de hojas y metanólico de frutos de *Cavendishia nitida*.**

Metabolitos Secundarios	Prueba	EHEtOHCn	EFMeOHCn
Flavonoides	Shinoda	+	+
	FeCl <sub>3</sub>	+	+++
	Rosenhein	+	+
Taninos	Gelatina - sal	+++	+++
Leucoantocianidinas	Leucoantocianidinas	+	+
Glicósidos de flavonoides o de terpenos	Antrona	+++	+++
Saponinas	Espuma	+++	+

	Dragendorff	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
	Valser	-	-
	Sesquiterpenlactonas / Cumarinas	Hidroxamato férrico	-
Triterpenos / Esteroides con grupos dieno conjugados reales o potenciales	Liebermann Burchard	-	-
Terpenos / Carotenoides	Salkowski	+	+
Glucósidos Cardiotónicos	Kedde	-	-

+: resultado positivo, +++: resultado positivo, muy abundante -: resultado negativo

### Fraccionamiento del extracto de hojas de *C. nitida* (EH<sub>Et</sub>OHC<sub>n</sub>).

En la Tabla 3 se observan los porcentajes de rendimiento de los extractos totales, siendo el mayor el correspondiente a EFMeOHC<sub>n</sub>. Por otro lado, la Tabla 4 muestra los porcentajes de rendimiento para las fracciones obtenidas, siendo las de mayor porcentaje FrAc, FrAcOEt, FrBu.

**Tabla 3. Porcentaje de rendimiento de los extractos EH<sub>Et</sub>OHC<sub>n</sub> y EFMeOHC<sub>n</sub>.**

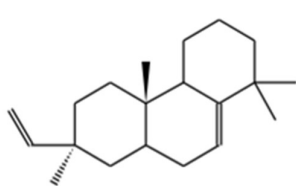
Extracto.	Peso (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
EH <sub>Et</sub> OHC <sub>n</sub>	112,20	15,4
EFMeOHC <sub>n</sub>	1,20	48

**Tabla 4. Porcentaje de rendimiento del EH<sub>Et</sub>OHC<sub>n</sub> y de las fracciones obtenidas.**

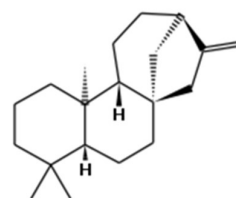
Extracto / Fracción.	Peso (g)	Porcentaje de Rendimiento (%)
FrHex	2,22	2,0
FrDCM	4,73	4,2
FrAcOEt	17,79	15,9
FrBu	15,00	13,4
FrAc	70,56	62,9

A partir del fraccionamiento en Hexano de EH<sub>Et</sub>OHC<sub>n</sub> se obtuvo 0,1142 g de FrHex1 de aspecto líquido amarillo, viscoso, la cual fue analizada mediante GC-MS, obteniéndose una mezcla de dos compuestos: Rimueno (**1**) y Kaur-16-eno (**2**), que presentan un 94% y 98% de coincidencia respectivamente, comparando sus espectros con los de las librerías del equipo. La mezcla se encuentra en proporción 1:4 de los compuestos **1** y **2** respectivamente. El Rimueno (**1**) es un diterpeno, y no se encuentra restringido taxonómicamente: Si bien ha sido reportado en plantas del género *Cavendishia*

y otros de la familia Ericaceae (Salasoo, 1989; Vasco Zamudio et al., 2019), también ha sido aislado de plantas de otras familias como Podocarpaceae, Cupressaceae, e Illiciaceae (Vijayakumar et al., 2012). Según la literatura consultada, estudios con extractos que contienen este compuesto han reportado actividad anticancerígena, y antimicrobiana, sin embargo, se desconoce si son causadas específicamente por este metabolito (Sylvestre, Legault, Dufour, & Pichette, 2005; Vijayakumar et al., 2012). En cuanto al Kaur-16-eno (2), otro diterpeno, ha sido reportado para el género *Cavendishia* de la familia Ericaceae (Vasco Zamudio et al., 2019), la familia Asteraceae (Santana Alba, 2010), puntualmente el género *Pentacalia*, y la familia Cupressaceae (Matsunaga et al., 2012). Es de destacar que los compuestos de tipo Kaurano cuentan con actividad antibacteriana (Santana Alba, 2010).

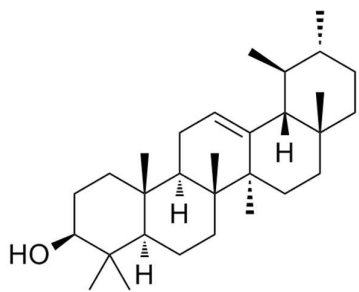


Rimueno (1)

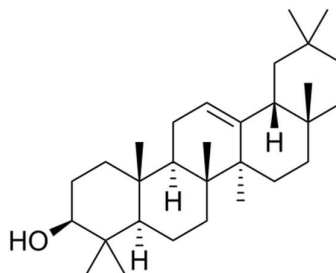


Kaur-16-eno (2)

Del fraccionamiento de FrHex2 se obtuvo un sólido blanco que se denominó Cn1. Según lo observado por GC-MS. Este sólido corresponde a una mezcla de dos triterpenos conocidos como  $\alpha$  – amirina (3) y  $\beta$  – amirina (4) en proporción 1:4 de los compuestos 3 y 4 respectivamente. Estos compuestos han sido reportados en plantas de las familias Ericaceae, Balanophoraceae, y Combretaceae y cuentan con estudios de actividad antiinflamatoria y antibacteriana (Malca García, Hennig, Sieler, & Bussmann, 2015; Matulevich, 2013; Salih et al., 2018).



$\alpha$  – amirina (3)



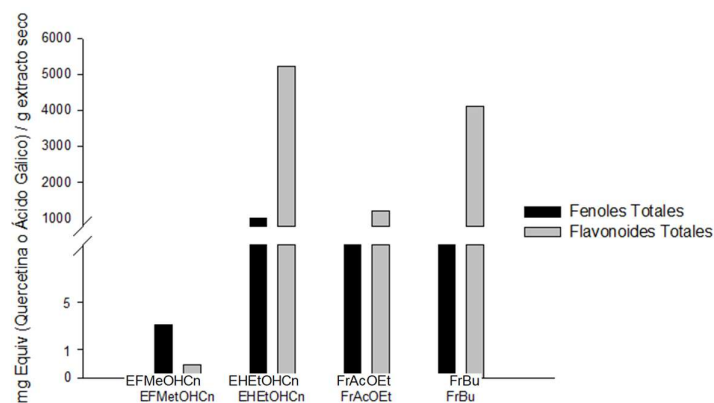
$\beta$  – amirina (4).

Es importante resaltar que estos metabolitos (1 – 4) son reportados por primera vez para la especie objeto de estudio.

### Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas totales.

La Figura 1 muestra los valores de fenoles (mg Eq de Ácido Gálico / g de Extracto Seco) y flavonoides totales (mg Eq de Quercetina / g de Extracto Seco) presentes en los extractos y fracciones analizadas. El extracto de hojas (EH<sub>EtOH</sub>Cn) presenta el mayor contenido de los dos metabolitos analizados, mientras que en el extracto de frutos (EF<sub>MeOH</sub>Cn) se encuentra menor cantidad.





**Figura 1. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos y fracciones analizadas.**

En Colombia es posible encontrar a *C. nitida* arriba de los 3000 msnm, y para el presente estudio la colecta se realizó a 3447 msnm. Es de destacar que a esa altitud las plantas se encuentran sometidas a estrés por baja temperatura, con el consecuente estrés oxidativo (Taiz, Zeiger, Møller, & Murphy, 2015). Según Akula & Ravishankar (2011) cuando las plantas están bajo estrés por baja temperatura aumenta la síntesis de flavonoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos, con el fin de mitigar los daños generados en la planta. Lo anterior podría explicar el contenido de estos compuestos en *C. nitida*.

Debe enfatizarse en los valores elevados de la cuantificación de flavonoides, dado que estos son compuestos con alta actividad farmacológica: Tienen actividad antiviral, antiinflamatoria, antifúngica, y gracias a su actividad antioxidante regulan la formación de especies reactivas de oxígeno y disminuyen procesos de degradación de macromoléculas como la peroxidación lipídica (Gutiérrez Gaitén, Miranda Martínez, Henriques, & del Barrio Alonso, 2010; Havsteen, 2002; Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002; Pourcel et al, 2007; Shakil, Kumar, Pandey, & Saxena, 2008)

Para *C. bracteata*, otra especie del mismo género, se observa una tendencia similar: Se reportan valores de flavonoides y fenoles elevados para las hojas, mientras que para los frutos no (Plazas González, 2015). Esta tendencia podría estar explicada por una mayor presencia de taninos en las hojas, en comparación con el resto de los órganos de la planta como se reporta en otras plantas de esta familia (Abreu Guirado, Cuéllar Cuéllar, & Prieto, 2008)

En cuanto a las antocianinas, se encontró que FrBu y EFMeOHCn presentaron el mayor contenido de las antocianinas 3-O-Arabinósido de cianidina (C3Ar), 3-O-Glucósido de cianidina (C3Gl), 3-O-Arabinósido de peonidina (P3Ar), 3-O-Glucósido de peonidina (P3Gl), y 3-O-Glucósido de petunidina (Pe3Gl), ver Tabla 5; mientras que en los demás extractos y fracciones es posible detectar la presencia de otras antocianinas diferentes a los patrones adquiridos, dada la presencia de absorbancias a 520 nm en diferentes tiempos de retención que los patrones mencionados. Lo anterior es importante teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y benéficas para la salud humana con las que cuentan estos compuestos. Particularmente por el consumo de sus frutos (Abril Ramírez, 2010; Brown & Shipley, 2011; Lee, Durst, & Wrolstad, 2005; Mark N. Merzlyak, Olga B. Chivkunova, Alexei E. Solovchenko, & K. Razi Naqvi, 2008)

Brown, Murch, & Shipley (2012) reportan para frutos de varios cultivares de *Vaccinium macrocarpon* valores elevados de C3Gl (80 µg/g), P3Gl (1500 µg/g), C3Ar (500 µg/g) y P3Ar (600 µg/g) en comparación con los calculados para FrBu y EFMeOHCn. Por otro lado, para *Vaccinium myrtillus* se reporta que Pe3Gl es el compuesto que se encuentra en menor cantidad, tal como ocurre en este caso para FrBu (Tabla 5.)

**Tabla 5. Contenido de antocianinas en extractos y fracciones analizadas.**

Fracción / Extracto	Tiempo de Retención	Concentración (µg de estándar / g de Fracción o Extracto)	Estándar de antocianina
EFMeOHCn	5,312	300,8	3-O arabinósido de cianidina.
	5,527	1,5	3-O glucósido de peonidina.
	6,144	1,2	3-O Glucósido de malvidina.
	4,748	34,5	3-O Glucósido de cianidina.
FrBu	5,515	256,5	3-O arabinósido de cianidina.
	6,315	26,8	3-O Glucósido de malvidina.
	7,488	4,32	3-O Glucósido de petunidina.

Un aspecto ecológico que puede incidir en los valores obtenidos para las antocianinas cuantificadas es el tamaño del fruto. En frutos de diferentes especies del género *Vaccinium* se observó que existe una relación entre la acumulación de antocianinas y el tamaño de los frutos: A menor tamaño del fruto, mayor será la acumulación de estos compuestos (Gao & Mazza, 1994). Lo anterior podría explicar el bajo contenido de antocianinas en los frutos de *C. nitida*, puesto que de acuerdo con Abril Ramírez (2010) las bayas del género *Cavendishia* son las de mayor tamaño. Según Villagra et al, (2014) estudios realizados en frutos del género *Gaultheria*, cuyos frutos no pasan de los 8 mm (Abril Ramírez, 2010), reportan valores de compuestos fenólicos superiores a los cuantificados en el presente trabajo.

#### **Actividad antioxidante de hojas y frutos de *C. nitida*.**

Para el análisis estadístico de cada variable, se evaluaron inicialmente los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En todos los casos los datos contaban con distribución normal y varianzas homogéneas (**P = 0,8721**) Teniendo en cuenta esto, se decidió calcular el coeficiente de correlación de Pearson para el análisis de estas.

Hay una correlación negativa entre los valores de IC<sub>50</sub> tanto para DPPH como ABTS, con el contenido de fenoles y flavonoides totales (**r < - 0,5**). Esto debido a que, a mayor contenido de flavonoides y compuestos fenólicos, será necesaria una menor concentración de muestra para inhibir el 50% del radical (que es lo que cuantifica el IC<sub>50</sub>), haciendo a su vez que cuenten con una mayor capacidad antioxidante (Giraldo Vásquez & Ramírez Aristizabal, 2013). En las muestras analizadas esto ocurre para FrAcOEt, y EHEtOHCn, para la cuantificación con ambos radicales (Tabla 6)

En la Tabla 6 se observan valores de IC<sub>50</sub> superiores para ABTS, en comparación con los obtenidos para DPPH. Esta tendencia concuerda con resultados obtenidos por Floegel et al (2011) en un estudio

hecho para varios alimentos. Si bien los dos ensayos se basan en un mismo principio, lo anterior pudo ser causado por tres motivos. El primero corresponde a las diferencias de longitud de onda en la que se llevan a cabo los ensayos: El de ABTS se mide a 740 nm, mientras que el de DPPH a 520 nm. La longitud de onda del ensayo de ABTS es lo suficientemente alta, como para evitar la interferencia en la absorbancia de compuestos coloreados como antocianinas y carotenoides, mientras que el DPPH no (Dastmalchi et al., 2011; Surveswaran, Cai, Corke, & Sun, 2007)

**Tabla 6. Valores de IC<sub>50</sub> para DPPH y ABTS en las fracciones analizadas.**

Extracto / Fracción	IC <sub>50</sub> DPPH (mg/L)	IC <sub>50</sub> ABTS (mg/L)
EfMeOHCn	164653,68	363580,67
EHEtOHCn	203,05	547,54
FrAcOEt	303,6184	725,19
FrBu	437,7713	1684,50

En segundo lugar, la diferencia en los valores pudo ser causada también por el mecanismo de la reacción en cada caso. La reacción en el ensayo de DPPH depende de la accesibilidad estérica de los compuestos al radical, entonces antioxidantes pequeños con alta accesibilidad tendrán una mayor actividad antioxidante, pero otros de gran tamaño, que reaccionan rápidamente con radicales peróxidos pueden reaccionar más lento, e inclusive ser inertes al DPPH por inaccesibilidad estérica; mientras que para el ABTS no se presenta este problema (Dastmalchi et al., 2011; Prior, Wu, & Schaich, 2005)

Finalmente, la diferencia en los valores pudo ser causada por la naturaleza de los compuestos en la muestra. El radical ABTS es soluble en un medio orgánico u acuoso, lo que permite que pueda reaccionar con compuestos de carácter lipofílico e hidrofílico, mientras que el radical DPPH solamente es soluble en un compuesto orgánico, por lo cual solo reacciona con compuestos de carácter lipofílico y no se tendrá en cuenta la actividad antioxidante de los hidrofílicos (Dastmalchi, 2008; Dastmalchi et al., 2011; Surveswaran et al., 2007).

En la Tabla 6 también se observa que el valor de IC<sub>50</sub> del ensayo con DPPH para EfMeOHCn es mayor que el valor de EHEtOHCn, en *C. nitida*. Lo anterior coincide con la literatura para otras especies pertenecientes a la familia Ericaceae. Además, si se compara con otras ericáceas del altiplano cundiboyacense, *C. nitida* tiene valores de IC<sub>50</sub> mayores para hojas y frutos (Plazas González, 2015) Por otro lado, los valores obtenidos para ABTS no fue posible compararlas con otras plantas de esta familia en Colombia debido a que no hay reportes en la literatura.

Por otro lado, hay una correlación (Pearson) fuerte entre el contenido de fenoles y flavonoides totales con los valores del porcentaje de inhibición al DPPH y al ABTS en todos los extractos ( $r > 0,9$ ) (Tabla 7). Lo anterior quiere decir que estos compuestos presentes en los extractos y fracciones analizadas son los principales responsables de la actividad captadora de radicales DPPH y ABTS (Dastmalchi et al., 2011). Esto ha sido observado en otros estudios realizados en plantas del género *Vaccinium* (Castrejón et al, 2008; Çelik et al, 2008; Giovanelli & Buratti, 2009). La actividad antioxidante de los flavonoides y compuestos fenólicos es causada por su capacidad de transferir electrones a los radicales libres con el fin de estabilizarlos gracias a su estructura (Pourcel et al., 2007)

**Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson para variables analizadas.**

Fracción / Extracto.	Variables analizadas.	r (DPPH)	r (ABTS)
EFMeOHCn	Fenoles Totales - % Inhibición.	0.9735	0.9830
	Flavonoides Totales - % Inhibición.		
EHEtOHCn	Fenoles Totales - % Inhibición.	0.9732	0.9669
	Flavonoides Totales - % Inhibición.		
FrAcOEt	Fenoles Totales - % Inhibición.	0.9291	0.9774
	Flavonoides Totales - % Inhibición.		
FrBu	Fenoles Totales - % Inhibición.	0.9833	0.9819
	Flavonoides Totales - % Inhibición.		

## CONCLUSIONES

- Los metabolitos identificados y cuantificados permiten comprobar la quimiotaxonomía de la familia Ericaceae, contribuyendo también al estudio químico de *C. nitida*. Se reportan por primera vez para la especie terpenos como el rimueno, la  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, el kaur-16-eno; antocianinas como arabinósido de cianidina, glucósido de peonidina, glucósido de malvidina, glucósido de cianidina y glucósido de petunidina.
- El contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas cuantificado en los extractos de hojas y frutos de *C. nitida* la hacen una planta promisoría en su aprovechamiento debido a los beneficios que traen estos compuestos a la salud humana. Este trabajo aporta valor agregado a la cadena productiva asociada al consumo de frutos nativos colombianos. En especial porque es la primera vez que se cuantifica el contenido de fitonutrientes y su actividad antioxidante para los frutos de *C. nitida*.
- El género *Cavendishia* se presenta como una alternativa útil ante el aprovechamiento de géneros más explotados comercialmente, como el género *Vaccinium*.

## AGRADECIMIENTOS.

A la profesora Elizabeth Gil por su constante guía y apoyo en el desarrollo del trabajo. Al profesor Néstor García, por su ayuda en la obtención del material. A los miembros del Grupo Javeriano de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ) que brindaron su colaboración en diferentes etapas del trabajo, y finalmente a mi familia y a mis amigos por su constante apoyo y acompañamiento.

## REFERENCIAS

- Abreu Guirado, O. A., Cuéllar Cuéllar, A., & Prieto, S. (2008). Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 13(3), 0.
- Abril Ramírez, D. L. (2010). *Las ericáceas con frutos comestibles del Altiplano Cundiboyacense*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10554/8516>
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin-ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877.

doi:10.1038/nprot.2007.102

- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613
- Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). 2019. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bilbao Rodriguez, M., Del Rosario. (1997). *Análisis fitoquímico preliminar. química de productos naturales* Universidad del Quindío. Retrieved from <http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat01040a&AN=pujbc.363548&lang=es&site=eds-live>
- Brown, P. N., Murch, S. J., & Shipley, P. (2012). Phytochemical diversity of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) cultivars by anthocyanin determination and metabolomic profiling with chemometric analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 261-271. doi:10.1021/jf2033335
- Brown, P. N., & Shipley, P. R. (2011). Determination of anthocyanins in cranberry fruit and cranberry fruit products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 94(2), 459-466. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21563679>
- Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564-572. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.007
- Çelik, H., Özgen, M., Serçe, S., & Kaya, C. (2008). Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 117(4), 345-348.
- Dampc, A., & Luczkiewicz, M. (2013). *Rhododendron tomentosum* (ledum palustre). A review of traditional use based on current research. *Fitoterapia*, 85, 130-143. doi:10.1016/j.fitote.2013.01.013
- Dastmalchi, K., Flores, G., Petrova, V., Pedraza-Penalosa, P., & Kennelly, E. J. (2011). Edible neotropical blueberries: Antioxidant and compositional fingerprint analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3020-3026.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Gao, L., & Mazza, G. (1994). Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. *Journal of Food Science*, 59(5), 1057-1059.
- García Barriga, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia. botánica medica* (2a ed. ed.) Tercer Mundo. Retrieved from <http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat01040a&AN=pujbc.538290&lang=es&site=eds-live>
- Garzón, G. A., Narváez, C. E., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2010). Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chemistry*, 122(4), 980-986. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.017
- Giraldo Vásquez, L. M., & Ramírez Aristizabal, L. S. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae). *Revista Cubana De Farmacia*, 47(4), 483-491.

- Giovanelli, G., & Buratti, S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, 112(4), 903-908.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15(1), 57-60. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-558X2015000100008&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2015000100008&lng=en&tlng=en)
- Gutiérrez Gaitén, Y. I., Miranda Martínez, M., Henriques, A. T., & del Barrio Alonso, G. (2010). Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Revista Cubana De Farmacia*, 44(3), 367-373.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385975>
- Lhuillier, A., Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fourasté, I., & Moulis, C. (2007). Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1160(1), 13-20. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.038
- Lluisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 934-942. doi:10.1002/fsn3.638
- Luteyn, J. (1983). Flora neotropica: Monograph 35 Ericaceae part I Cavendishia. *The New York Botanical Garden, New York, USA*.
- Luteyn, J. L., Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1980). A survey of the flavonoids and simple phenols in leaves of Cavendishia (Ericaceae). *Brittonia*, 32(1), 1-16.
- Malca Garcia, G. R., Hennig, L., Sieler, J., & Bussmann, R. W. (2015). Constituents of *Corynaea crassa* "Peruvian Viagra". *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 25(2), 92-97. doi:10.1016/j.bjp.2015.02.007
- Mark N. Merzlyak, Olga B. Chivkunova, Alexei E. Solovchenko, & K. Razi Naqvi. (2008). Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3903-3911. doi:10.1093/jxb/ern230
- Matsunaga, S. N., Chatani, S., Nakatsuka, S., Kusumoto, D., Kubota, K., Utsumi, Y., . . . Hiura, T. (2012). Determination and potential importance of diterpene (kaur-16-ene) emitted from dominant coniferous trees in Japan. *Chemosphere*, 87(8), 886-893. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.040
- Matulevich Peláez, J. A. (2013). Estudio fitoquímico de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* Mutis ex Linné Filius (Ericaceae) y evaluación de su actividad antiinflamatoria Retrieved from [https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od\\_\\_\\_\\_\\_3056::79eeb71bd630c2356120d8739733bf94](https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od_____3056::79eeb71bd630c2356120d8739733bf94)
- Nuengchamngong, N., & Ingkaninan, K. (2017). An on-line LC-MS/DPPH approach towards the quality control of antioxidative ingredients in sahasara. *Songklanakarín Journal of Science &*

- Technology*, 39(1), 123-129. Retrieved from <http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=121770776&lang=es&site=ehost-live>
- Orduz, L. (2017). *Perfilado metabólico de plantas del género Virola spp (Myristicaceae) provenientes de la Amazonía y Orinoquía Colombiana y evaluación de la actividad antifúngica contra Fusarium oxysporum*. Universidad Nacional de Colombia. *Sped理工系英和*, 1-127. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co>
- Plazas González, E. A. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de ericaceas colombianas. *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 20(2), 182-199. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962015000200004&lng=en&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000200004&lng=en&tlng=en)
- Pourcel, L., Routaboul, J., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: From biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29-36.
- 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.
- Salasoo, I. (1989). Epicuticular wax hydrocarbons of ericaceae in british columbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(5), 381-384. doi:10.1016/0305-1978(89)90052-5
- Salih, E. Y. A., Julkunen-Tiitto, R., Lampi, A., Kanninen, M., Luukkanen, O., Sipi, M., . . . Fyhrquist, P. (2018). *Terminalia laxiflora* and *Terminalia brownii* contain a broad spectrum of antimycobacterial compounds including ellagitannins, ellagic acid derivatives, triterpenes, fatty acids and fatty alcohols. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 82-96. doi:10.1016/j.jep.2018.04.030
- Santana Alba, I. F. (2010). Estudio Químico De La Especie Colombiana *Pentacalia Abietina* (Willd.Ex.Wedd) Cuatr.Como Nueva Fuente Natural De Compuestos Tipo Kaurano Y Quinol. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10554/8516>
- Shakil, N. A., Kumar, J., Pandey, R. K., & Saxena, D. B. (2008). Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry*, 69(3), 759-764.
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953.
- Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., & Pichette, A. (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of myrica gale L. *Phytomedicine*, 12(4), 299-304.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 782 p.
- Vasco Zamudio, S. P., Castrillón Cardona, W. F., Matulevich Pelaez, J. A., & Díaz Barrera, L. X. (2019). Estudio fitoquímico de hojas de *Cavendishia compacta* (Ericaceae) y evaluación de su actividad antiinflamatoria. *Revista Colombiana De Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(1), 61-79. doi:10.15446/rcciquifa.v48n1.80065
- Vijayakumar, A., Duraipandiyar, V., Jeyaraj, B., Agastian, P., Raj, M. K., & Ignacimuthu, S. (2012). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of *Illicium griffithii* Hook. F. & thoms extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 190-199.
- Villagra, E., Campos-Hernandez, C., Cáceres, P., Cabrera, G., Bernardo, Y., Arencibia, A., . . . García-Gonzales, R. (2014). Morphometric and phytochemical characterization of chaura fruits (*Gaultheria pumila*): A native chilean berry with commercial potential. *Biological Research*, 47(1), 26.

Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105. doi:10.1080/00218839.1998.11100961

Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224. doi:10.1016/j.foodres.2010.10.033