

## Actividad Antibacteriana y Antioxidante de los extractos de *Hibiscus escobariae* Fryxell, *Loxopterygium huasango* R. Spruce y *Croton ferrugineus* Kunth

Antibacterial and antioxidant activities of ethanolic extracts of *Hibiscus escobariae* Fryxell, *Loxopterygium huasango* R. Spruce and *Croton ferrugineus* Kunth

Viviana Valdez<sup>1</sup>, Shirley Moncayo<sup>2\*</sup>, Xavier Cornejo<sup>3</sup> & Jhon Castillo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Consultor, egresado de la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales.

<sup>2</sup>Bióloga, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil

<sup>3</sup>Herbario GUAY Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales - sede Mapasingue.

<sup>4</sup>Estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil.

Recibido 1 de abril 2019; recibido en forma revisada 8 de mayo 2019, aceptado 1 de junio 2019  
Disponble en línea 26 de junio 2019

### Resumen

En el presente trabajo se realizó el tamizaje fitoquímico, cuantificación de flavonoides y fenoles totales y la evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos obtenidos de hojas de *Hibiscus escobariae*, *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus*, contra tres bacterias Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*) y tres Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*). Para el análisis de las muestras se realizó el tamizaje fitoquímico por el método de Domínguez, la cuantificación de flavonoides por el método colorimétrico cloruro de aluminio, la cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, actividad antibacteriana por ensayos de difusión por disco y actividad antioxidante mediante la técnica DPPH. En el tamizaje fitoquímico los flavonoides y taninos se presentaron en mayor cantidad, mientras que los alcaloides, quinonas, antraquinonas, esteroides y saponinas estuvieron presentes en menor proporción. El contenido de flavonoides varió de  $100,95 \pm 1,73$  a  $995,42 \pm 3,16$  mg CE / g extracto en *H. escobariae* y *L. huasango* y el contenido de fenoles varió de  $10,17 \pm 0,22$  a  $314,72 \pm 1,91$  mg GAE/ g extracto en *Croton ferrugineus* y *L. huasango* que también obtuvo la mejor actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas con CMI que varían de 2.5 a 5 mg/mL y la mejor actividad antioxidante con IC50 de 0,1 mg/m y de 0,7 mg/mL para *Croton ferrugineus* con una diferencia significativa  $p < 0.05$ . Estos resultados son los primeros reportados los que servirán como línea base para estudios posteriores.

**Palabras claves:** antibacteriano, antioxidante, *Croton ferrugineus*, fenoles, flavonoides, *Hibiscus escobariae*, *Loxopterygium huasango*, tamizaje fitoquímico.

### Abstract

This study has done phytochemical screening, quantification of flavonoids and total phenols, evaluation of antibacterial activity against three Gram positive bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*), three Gram negatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*) and the evaluation antioxidant activity of ethanolic extracts of *Hibiscus escobariae*, *Loxopterygium huasango* and *Croton ferrugineus*. The sample analysis employed phytochemical screening by Domínguez's method, quantification of flavonoids by the aluminum chloride colorimetric method, quantification of total phenols by the Folin-Ciocalteu method, antibacterial activity by disk diffusion assay and antioxidant activity by DPPH method. In the phytochemical screening, the flavonoids and tannins were higher proportion, while alkaloids, quinones, anthraquinones, steroids and saponins were present in lower proportion. The flavonoid content varied in a range of  $100.95 \pm 1.73$  and  $995.42 \pm 3.16$  mg CE / g extract, in *H. escobariae* and *L. huasango* and the total phenol content varied in a range of  $10.17 \pm 0.22$  a  $314.72 \pm 1.91$  mg GAE/ g extract in *C. ferrugineus* and *L. huasango*, which also obtained the best antibacterial activity against all the strains evaluated with MIC that varied of 2.5 - 5 mg/mL and also obtained the best antioxidant activity with a IC50 of 0.1 mg/mL and 0.7 mg/mL for *Croton ferrugineus* with a significant difference  $p < 0.05$ . These results are the first reported and will serve as a baseline for further studies.

**Key words:** antibacterial, antioxidant, *Croton ferrugineus*, flavonoids, *Hibiscus escobariae*, *Loxopterygium huasango*, phenols, phytochemical screening.

\* Correspondencia del autor:

E-mail: shirmoncayob@gmail.com



2019 Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil. Este obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional

## Introducción

Un antioxidante es una molécula que posee la capacidad de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, que pueden conducir al organismo a un estrés oxidativo; lo que provoca una amplia diversidad de enfermedades como la hipertensión arterial, psoriasis, diabetes mellitus, entre otras, debido a que la defensa antioxidante es insuficiente (Lee *et al.*, 2004; Pham-Huy, 2008). La ingesta de una dieta rica en antioxidantes de origen natural, presentes en frutas y vegetales disminuye el riesgo de padecer enfermedades provocadas por estrés oxidativo (Paredes, 2010).

Los productos obtenidos de las plantas como los extractos y sus compuestos puros, otorgan una gran cantidad de oportunidades para poder crear nuevos medicamentos que beneficien al control microbiano. Uno de los problemas actuales es la resistencia que presentan una serie de bacterias a los antibióticos, debido a mutaciones en sus genes o por la adquisición de genes de resistencia presentes en otros microorganismos (Fernández *et al.*, 2003).

En la medicina, actualmente existen un 30% de fármacos provenientes del reino vegetal, esta cifra tiende a elevarse en los últimos años debido al descubrimiento de los principios activos presentes en las plantas. Los metabolitos secundarios presentes en ellas poseen un gran interés biomédico, por las diversas actividades biológicas que poseen como antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, entre otros (Villareal, *et al.* 2014).

El género *Hibiscus* pertenece a la familia Malvaceae y se caracteriza por tratar afecciones como la hipertensión arterial, procesos inflamatorios, afecciones hepáticas, entre otras (Carretera y Ortega, 2017).

La especie *Loxopterygium huasango* de la familia Anacardiaceae es empleada como antiviral, diaforético, anestésico, repelente, catártico (Bussman, *et al.*, 2009; Aguirre, 2012).

*Croton ferrugineus* es un arbusto que pertenece a la familia Euphorbiaceae se han descrito experiencias como antiséptico, cicatrizante, antiinflamatorio y antiarréicos (Ordoñez, 2016).

## Materiales y Métodos

### Material biológico

En mayo del 2018 se recolectaron hojas frescas de *Hibiscus escobariae* y *Loxopterygium huasango* en el predio de la Universidad de Guayaquil, mientras que *Croton ferrugineus* se recolectó en la Provincia de Loja. La identificación botánica fue realizada por el Herbario GUAIIY

### Obtención del extracto

Las muestras vegetales se secaron durante dos días a temperatura de 40 °C, en una estufa con circulación

de aire; luego de este período se procedió a la maceración de hojas con etanol al 99%, el cual estuvo en reposo durante 4 días en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Luego se filtraron los extractos y se concentraron a presión reducida en un Rotavapor (R-3 BUCHI).

### Tamizaje fitoquímico

Los metabolitos secundarios tales como: alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas y antraquinonas, saponinas, esteroides y triterpenos se determinaron mediante la metodología propuesta por Domínguez (1979).

### Determinación de alcaloides

A cada 10 mg de extracto se le añadieron 2 mL de ácido clorhídrico al 5%.

Posteriormente se agregaron de 2-5 gotas de los reactivos Wagner, Mayer, Bouchardat y Dragendorff. Se consideró como positiva las pruebas en las que se observó un precipitado color rojo marrón (Wagner), blanco (Mayer), pardo (Bouchardat) y naranja-rojizo para el reactivo Dragendorff.

### Determinación de Flavonoides

*Prueba de Shinoda*: A 1 mL de extracto diluido se le añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La formación del color rojo indicó la presencia de auronas y chalconas. En los casos en que no se observaron cambios de color, se añadieron piezas de magnesio metálico. La formación de coloraciones naranja, roja o magenta indicó la presencia de flavonas y flavonoides, respectivamente.

*Prueba de hidróxido de sodio (10%)*: A 1 mL de extracto diluido en etanol absoluto se le añadieron 3 gotas de hidróxido de sodio al 10%. La Formación de coloración rojoamarillo, café-naranja, púrpura-rojo o azul indicó la presencia de xantonas y/o flavonas, flavonoides, chalconas y antocianinas, respectivamente.

### Determinación de Taninos.

*Reacción cloruro férrico*: A 1 mL del extracto etanólico se le añadieron gotas de la solución de cloruro férrico al 10%. La formación de una coloración azul indicó la presencia de taninos hidrolizables y el color verde, indicó la presencia de taninos condensados.

### Determinación de quinonas y antraquinonas

*Prueba de Borntrager*: Se llevó a sequedad 5mL de extracto y se añadieron 4 mL de la solución de hidróxido de potasio al 5%, se llevó el tubo a ebullición por 3 minutos a baño María, se dejó enfriar, se añadieron 2 mL de cloroformo, se agitó para la extracción y la fase acuosa se descartó, mientras que a la fase orgánica se le adicionaron 2 mL de una solución de hidróxido de potasio al 5%. La formación del color rojo indicó la presencia de antraquinonas.

*Prueba de ácido sulfúrico*: A 10 mg de extracto etanólico se le añadió 1 gota de ácido sulfúrico

concentrado. La formación de color rojo indicó la presencia de quinonas.

#### Determinación de esteroides y triterpenos

**Prueba de Salkowski:** A 3 mL de extracto etanólico se le añadieron 2 mL de cloroformo y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado hasta que se formó una doble fase. La formación de color pardo en la capa media indicó un anillo esteroideo.

**Prueba Lieberman Bouchard:** A 2 mL de extracto etanólico se le añadió 1 mL de anhídrido acético y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó en reposo por de 5 minutos. La formación de una capa intermedia de color azul-verde indicó esteroides, y el color rosado, rojo, magenta o violeta reveló la presencia de terpenoides.

#### Determinación de saponinas

**Prueba de la espuma:** A 20 mg del extracto etanólico se le añadió 1 mL de agua destilada caliente, se agitó vigorosamente para formar espuma, se dejó reposar durante 10 minutos. El contenido de saponina se midió de la siguiente manera: sin espuma (ausencia); espuma menos de 3 mm de alto (pobre); espuma de 6 mm de altura (moderada) y espuma de más de 8 mm de altura (abundante).

#### Cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos totales

Se cuantificó los flavonoides totales mediante el método colorimétrico cloruro de aluminio propuesto por Zhishen *et al.*, (1999) y la cuantificación de fenoles totales se la realizó mediante el método Folin Cioaltea propuesto por Singleton *et al.*, (1999).

#### Cuantificación de Flavonoides Totales

Para la cuantificación de flavonoides totales se realizó una curva de calibración utilizando la quercetina como patrón de referencia a una concentración de 0.1 mg/mL. Para realizar el tratamiento de la curva de calibración se añadió una alícuota (0.25 mL) de solución estándar de quercetina (20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750 µg/ mL) a un tubo de ensayo de 15 mL. Se agregó un 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se añadió al tubo de ensayo 0.075 mL de NaNO<sub>2</sub> al 5%. Después de 6 minutos, se agregó 0,075 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10%. Después de 5 minutos, 0.5 mL de NaOH 1 M y completar el volumen total hasta 2.5 mL con H<sub>2</sub>O. Se mezcló bien la solución y se colocó 200 µL en los micros placas. La absorbancia se midió frente a blanco de reactivo preparado a 510 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El contenido total de flavonoides se expresó como mg equivalentes de Quercetina (CE) / g de masa fresca.

Para el análisis de las muestras por triplicado, se utilizó una concentración de 0.5 mg/mL de etanol absoluto. Posteriormente se sometió al mismo tratamiento que la curva de calibración.

#### Cuantificación de Ácido Fenólicos Totales

Para la cuantificación de ácidos fenólicos totales se

realizó una curva de calibración utilizando el ácido gálico como patrón de referencia a una concentración de 0.5 mg/mL. Para realizar el tratamiento de la curva de calibración se añadió una alícuota (150 mL) solución estándar de Ácido gálico (30, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 210 µg/ mL) a un tubo de ensayo de 15 mL. Se agregó 75 µL de Folin-Cicaltea. Inmediatamente se agitó en vortex. Se Esperó 10 minutos, en absoluta oscuridad. Se añadió 375 µL de la solución de Carbonato de sodio. Se agitó y guardó en absoluta oscuridad por 30 minutos. Se colocó 200 µL en los micros placas. La absorbancia se midió frente a blanco de reactivo preparado a 760 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El contenido total de fenoles se expresó como mg equivalentes de Ácido Gálico (GAE) / g de extracto seco.

Para el análisis de las muestras por triplicado, se utilizó una concentración de 0.5 mg/mL de etanol absoluto. Posteriormente se sometió el mismo tratamiento que la curva de calibración.

#### Actividad antibacteriana

Las pruebas de actividad antibacteriana se la realizaron mediante la metodología de ensayos de difusión por disco propuesta por Bauer-Kirby (1966), contra tres bacterias Gram Positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y tres Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802). Se realizó la siembra en el medio Müller-Hinton Agar a 37 °C durante 18 h, luego se seleccionaron de 3-5 colonias de cada microorganismo de un cultivo puro de no más de 24 horas de su inoculación, se transfirieron las colonias a un tubo que contenía de 3-5 mL de solución salina, se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 1,0 de McFarland. Se agregaron 200 µL de la suspensión del microorganismo y se lo distribuyó en toda la placa de Müller-Hinton Agar de manera homogénea con ayuda de un asa de inoculación, se esperó 15 minutos manteniendo la caja Petri cerrada para que la superficie del medio sembrado se seque. Posteriormente se colocaron los discos de 6 mm de diámetro con 20 µL de antibiótico como control positivo, etanol como control negativo y los extractos que previamente fueron diluidos con etanol a 20, 50, 100 y 200 mg/mL. Se incubaron las placas sembradas a 35 °C por 16-18 horas. La CIM se definió como la concentración más baja que inhibía el crecimiento bacteriano visible.

Los antibióticos que se usaron de referencia fueron:

Ceftriaxone® Oxoid™ (30 µg) para *Staphylococcus aureus*; Sulfamethoxazole® Oxoid™ (25 µg) para *Bacillus subtilis*; Penicillin® G Oxoid™ (10 µg) para *Listeria monocytogenes*; Gentamicin® Oxoid™ (10 µg) para *Escherichia coli*; Tobramicina® Oxoid™ (10 µg) para *Pseudomonas aeruginosa*; Tetracycline® Oxoid™ (30 µg) para *Vibrio parahaemolyticus*

### Actividad antioxidante

Las pruebas de actividad antioxidante se la realizaron por la técnica DPPH (2,2-difenil1-picrilhidrazilo) propuesta por Williams *et al.*, (1995) utilizando el ácido ascórbico como blanco positivo. Se preparó una solución stock de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  M) en metanol, para preparar la solución de trabajo se tomó 5 mL de esta solución y se aforó a 50 mL con metanol. Se preparó una solución de ácido ascórbico 1 mM, luego se preparó la solución stock de la muestra con 4 mg de extracto que se aforó a 1 mL de metanol. En tubo de ensayo se colocaron 50  $\mu$ L de solución de ácido ascórbico y 700  $\mu$ L de la solución de trabajo y se agitó. Se tomaron 50  $\mu$ L de la solución stock de muestra de extracto y se agregaron 700  $\mu$ L de la solución de trabajo y se agitó. Posteriormente se dejaron los tubos en oscuridad y cubiertos durante 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 517 nm del blanco (metanol), de la solución DPPH, del ácido ascórbico y de las muestras. La absorbancia del DPPH estuvo en un rango de 0.600 a 0.700 nm. Las muestras se analizaron por triplicado.

Los cálculos del porcentaje de inhibición se lo realizaron con la siguiente fórmula:

$$\%I = \left[ \frac{\text{Abs del DPPH} - \text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del DPPH}} \times 100 \right]$$

Cuando el porcentaje de inhibición de la muestra fue mayor al 50 %, se aplicaron diluciones de la solución stock de extracto para lograr encontrar la concentración mínima inhibitoria.

### Análisis estadístico

Se comparó el porcentaje de inhibición del DPPH de *Hibiscus escobariae*, *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus*, frente al ácido ascórbico, realizando un test de Anova simple, mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus.

## Resultados

### Tamizaje fitoquímico

La Tabla 1 resume los resultados de los metabolitos secundarios presentes en *Hibiscus escobariae*, *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus*. Los alcaloides se presentaron en proporciones abundantes en *L. huasango*, mientras que en *H. escobariae* y *C. ferrugineus* se presentaron en bajas proporciones. Los flavonoides y taninos se presentaron de manera abundante en las tres plantas evaluadas. Esteroles y triterpenos se presentaron en cantidades moderadas en *H. escobariae* y en bajas proporciones en *L. huasango*. Quinonas, antraquinonas fueron abundantes en *L. huasango* mientras que en *C. ferrugineus* se presentaron en

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de obtenidos de tres plantas recolectadas en el Ecuador

Metabolito	Ensayo	<i>Hibiscus escobariae</i>	<i>Loxopterygium huasango</i>	<i>Croton ferrugineus</i>
Alcaloides	Reactivo Mayer	+	+++	-
	Reactivo Buchardat	-	+++	-
	Reactivo Wagner	-	++	-
	Reactivo Dragendorff	++	++	+
Flavonoides	Reactivo Shinoda NaOH 10%	+++	+++	+++
		+++	+++	+++
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++	+++
Esteroles y triterpenos	Reactivo Salkowski	+	+	+
	Reactivo LiebermannBurchard	++	-	++
Quinonas y antraquinonas	Reactivo Borntrager	-	+++	+
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-
Saponinas	Espuma	-	3mm	3mm

Clave: Ausente (-), Bajo (+), Moderado (++) , Abundante (+++). Saponinas: Espuma: Ausente (-), Pobre (< 3mm), Moderado (>6mm), Abundante (>8mm).

bajas proporciones. Las saponinas solo estuvieron presentes en la especie *L. huasango*.

#### Cuantificación de flavonoides

En la tabla 2, el contenido total de flavonoides se determinó usando la ecuación de regresión lineal y quercetina como estándar ( $y=0,000451888x+0,0668373$ )  $R^2=0,987$ , mostrando un rango de  $100,95 \pm 1,73$  a  $995,42 \pm 3,16$  mg CE / g extracto. Siendo *L. huasango* el que obtuvo el mayor contenido total de flavonoides.

#### Cuantificación de fenoles

En la tabla 3, el contenido total de fenoles se determinó usando la ecuación de regresión lineal y ácido gálico como estándar ( $y=0,00673906x+0,0503209$ )  $R^2= 0,996$ , mostrando un rango de  $10,17 \pm 0,22$  a  $10,17 \pm 0,22$  mg GAE/ g extracto. *L. huasango* fue el que obtuvo el mayor contenido de fenoles totales.

#### Actividad antibacteriana

En la Tabla 4 resumen los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/mL de los extractos etanólicos de hojas de tres especies de plantas del Ecuador. *H. escobariae*, solo presentó actividad antibacteriana frente a *B. subtilis* con una CMI de 100 mg/mL y frente a *L. monocytogenes* con una CMI de 50 mg/mL. La especie *L. huasango* fue la que obtuvo la mejor actividad antibacteriana frente

a todas las bacterias evaluadas, presentando CMI que varió de 2,5 - 5 mg/mL. *C. ferrugineus* solo presentó actividad frente a *E. coli* con una CMI de 200 mg/mL.

#### Actividad antioxidante

En la Tabla 5 se muestran los resultados de los extractos etanólicos de hojas de tres especies de plantas del Ecuador. *H. escobariae* fue el que obtuvo el menor porcentaje de inhibición del radical DPPH con  $47,33 \pm 1,26$  y no presentó la concentración de inhibición del 50% ( $IC_{50}$ ), mientras que *L. huasango* fue el que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición de  $92,97 \pm 0,81$ , presentando un  $IC_{50}$  de 0,1 mg/ML, seguido de *C. ferrugineus* el cual presentó un porcentaje de inhibición de  $82,95 \pm 0,35$ , con un  $IC_{50}$  de 0,7 mg/mL.

En el Gráfico 1, se compara el porcentaje de inhibición del radical DPPH de las tres especies evaluadas frente al ácido ascórbico. Se puede observar que la especie *Hibiscus escobariae* presentó un 47,33% de inhibición, mostrando una gran diferencia frente al porcentaje de inhibición del ácido ascórbico que fue de 95,32%. *Loxopterygium huasango* presentó un porcentaje de inhibición del 92,97%, siendo muy similar al del ácido ascórbico con un 95,32%. *Croton ferrugineus* presentó un porcentaje de inhibición del radical DPPH del 82,95%, estando cerca al porcentaje de inhibición de 95,32% del ácido ascórbico.

Tabla 2. Contenido total de Flavonoides

Especie	Flavonoides totales (mg CE / g extracto)
<i>Hibiscus escobariae</i>	100,95 ± 1,73
<i>Loxopterygium huasango</i>	995,42 ± 3,16
<i>Croton ferrugineus</i>	190,50 ± 0,83

Tabla 3. Contenido total de fenoles

Especie	Fenoles (mg GAE/ g extracto)
<i>Hibiscus escobariae</i>	12,24 ± 0,22
<i>Loxopterygium huasango</i>	314,72 ± 1,91
<i>Croton ferrugineus</i>	10,17 ± 0,22

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de los extractos etanólicos de hojas de tres especies de plantas del Ecuador

Bacterias	Especie		
	<i>Hibiscus escobariae</i>	<i>Loxopterygium huasango</i>	<i>Croton ferrugineus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	5	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	100	5	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	50	2,5	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	2,5	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-	2,5	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	-	2,5	-



**Tabla 5.** Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas de tres especies de plantas del Ecuador

Especie	Porcentaje de inhibición (%)	IC <sub>50</sub> mg/mL
<i>Hibiscus escobariae</i>	47,33 ± 1,26	-
<i>Loxopterygium huasango</i>	92,97 ± 0,81	0,1
<i>Croton ferrugineus</i>	82,95 ± 0,35	0,7

Clave: IC<sub>50</sub>: Concentración de inhibición del 50%; (-) Ausente

### Análisis estadístico

Puesto que el p-valor del test de Anova simple fue inferior a 0,05, hubo diferencia significativa estadísticamente entre las medias de la actividad antioxidante de una especie a otra con el ácido ascórbico, para un nivel de confianza del 95%.

### Discusiones

#### *Hibiscus escobariae*

*Hibiscus escobariae* (Malvaceae), presentó poco contenido de alcaloides, esteroides y triterpenos; los flavonoides y taninos fueron abundantes, mientras que las quinonas, antraquinonas y saponinas estuvieron ausentes. La presencia de estos metabolitos y ausencia de saponinas coincide con los resultados reportados por Prasad (2014), para las especies del género *Hibiscus* (Serban *et al.* 2015). La presencia de estos metabolitos le otorgaría a *H. escobariae*, las propiedades antimicrobiana, antioxidante, diurética, antiespasmódica, cardioprotectora, entre otras, que presentan las especies de su mismo género (Vasudeva *et al.* 2008).

Las hojas de *Hibiscus escobariae* presentaron elevados contenidos de flavonoides con un total de 100,95 mg CE/g de extracto y de fenoles con un total de 12,24 mg GAE/g de extracto. Estos valores son muy cercanos al contenido de fenoles totales de la especie *Hibiscus sabdariffa* con 14,18 mg GAE/ g de extracto (Vivas *et al.*, 2014). *H. escobariae* no presentó actividad antioxidante a pesar de tener elevados contenidos de flavonoides y fenoles; lo cual difiere de los estudios realizados a otras especies de su mismo género. Medina *et al.* (2013) y Reyes *et al.*, (2015) afirman que la estructura química y concentraciones de antocianinas y otros polifenoles presentes en las flores y cáliz son los responsables de la actividad antioxidante en *Hibiscus sabdariffa*. Probablemente esta sea la razón por la cual *H. escobariae* no expresó inhibición mayor al 50% del DPPH, debido a que en el presente trabajo se utilizó el extracto de hojas; mientras que en los otros trabajos realizados a distintas especies de *Hibiscus* se emplearon otras partes aéreas de la planta excepto sus hojas (Gomes *et al.*, 2010).

Diversos estudios confirman que los flavonoides y taninos son los responsables de la actividad antibacteriana y antioxidante (Serban *et al.* 2015, Buckholz *et al.* 2016, Carretera y Ortega, 2017).

Posiblemente el alto contenido de flavonoides y taninos que presentó *H. escobariae*, sean los responsables de la actividad antibacteriana frente a

*Bacillus subtilis* (CMI 100 mg/mL) y frente a *Listeria monocytogenes* (CMI 50 mg/mL); lo cual coincide con los estudios realizados por Chung *et al.* (2004), quienes mencionan que los extractos evaluados de diferentes especies de la familia Malvaceae no presentaron inhibición frente a bacterias Gram negativas. Probablemente este resultado sea debido a la capsula externa de lipopolisacárido y lipoproteína, que poseen las bacterias; las cuales son resistentes a compuestos antibacterianos (Chopra *et al.*, 2001; Alzoreky *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados presentados difieren de la especie *Hibiscus sabdariffa*; la cual obtuvo inhibición frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* observándose una CMI de 25 a 200 mg/mL (Sulaiman *et al.*, 2014).

#### *Loxopterygium huasango*

*Loxopterygium huasango* (Anacardiaceae), presentó alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas y antraquinonas en proporciones abundantes; mientras que los esteroides, triterpenos y saponinas, presentaron poco contenido. Estos resultados coinciden con los metabolitos secundarios reportados por Bussman *et al.* (2009). La presencia de estos metabolitos es común en la familia Anacardiaceae. (Suzimone *et al.* 2006).

Se ha reportado que los altos contenidos de flavonoides y taninos son los responsables de la actividad antibacteriana, antioxidante, citotóxica, diaforética, antiinflamatoria y antiviral, en diversas especies de la familia Anacardiaceae; mientras que los alcaloides, le otorga propiedades analgésicas y anestésicas; y las quinonas y antraquinonas son los responsables de actuar como laxantes (Silva *et al.*, 2015; Sepúlveda *et al.* 2003; Bustamante *et al.* 2010). La presencia de estos metabolitos secundarios en *L. huasango* confirmaría su uso en la medicina tradicional como antiviral, diaforético, anestésico, repelente y catártico (Bussman, *et al.*, 2009; Aguirre, 2012).

A pesar de que hubo diferencia significativa estadísticamente entre *L. huasango* y el ácido ascórbico, el porcentaje de inhibición del radical DPPH en *L. huasango* fue de 92,97%, cercano al del ácido ascórbico (Vitamina C) que obtuvo un porcentaje del 95,48%. Lo que coincide con los estudios realizados por Sanchez *et al.* (2000), quienes mencionan que la actividad antioxidante presentes en los compuestos fenólicos en algunos géneros de la familia Anacardiaceae, se debe a capacidad funcional de excelentes captadores de radicales libres, ejerciendo efecto inhibitorio sobre la peroxidación de fosfolípidos. Además, de presentar una mejor actividad antioxidante que la vitamina C, E y β-carotenos. Estudios realizados por Garrido

*et al.* (2004), mencionan que los flavonoides de tipo biflavonoides y otros compuestos fenólicos comunes en algunas especies de la familia Anacardiaceae, son el componente principal de una marca de productos antioxidantes 100% naturales denominada VIMANG®. Por lo tanto, *L. huasango* al haber presentado un porcentaje de inhibición del DPPH cercano al del ácido ascórbico, podría ser empleado para la creación de nuevos fármacos naturales con capacidad antioxidante.

El extracto de *L. huasango*, presentó una excelente actividad antibacteriana frente a todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas evaluadas y a mínimas concentraciones (2,5 - 5 mg/mL). Probablemente la actividad antibacteriana determinada en *L. huasango* se deba al elevado contenido de flavonoides y taninos analizados, lo que confirman los estudios realizados por Suzimone *et al.* (2006), quienes mencionan que los compuestos fenólicos presentes en la familia Anacardiaceae son los responsables de la actividad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, debido a que en su estructura poseen una hidroxilación en el anillo B, lo cual inhibe la síntesis de ADN y ARN de las bacterias (López, 2010).

#### ***Croton ferrugineus***

*Croton ferrugineus* (Euphorbeaceae), en el tamizaje fitoquímico presentó elevadas cantidades de flavonoides y taninos, mientras que los alcaloides, esteroides, triterpenos, quinonas, antraquinonas y saponinas se presentaron en bajas proporciones. Los metabolitos presentes en *Croton ferrugineus* son comunes a los reportados en distintas especies del género *Croton* (Barrera *et al.*, 2016). Se han realizado diversos trabajos de aislamiento de alcaloides, flavonoides, taninos y terpenoides a los cuales se le atribuyen actividades biológicas como: antimicrobianas, antiinflamatorias, cardiotónicas y espasmolíticas (Salatino *et al.* 2007, Ordoñez, 2016).

El alto contenido de flavonoides y taninos que presentó *Croton ferrugineus*, podría ser el responsable de la actividad antioxidante cercana a la del ácido ascórbico (Vitamina C). Estos resultados son similares a los obtenidos por Altamirano (2015), quien evaluó la presente actividad con cuatro especies del género *Croton*, donde menciona que todas presentaron una actividad antioxidante similar a la del ácido ascórbico. En diversas especies del género *Croton* se ha encontrado la presencia de flavonoides de tipo flavonoles y flavonas y taninos como proantocianidinas, responsables de la propiedad antioxidante debido a los grupos hidroxilos que presentan en el anillo B y la doble ligadura que se presentan en algunos flavonoides en el anillo C (Salatino *et al.*, 2007).

A pesar de que *Croton ferrugineus* obtuvo elevados contenidos de flavonoides y fenoles totales, solo presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, lo que difiere de la especie *C. laui*, que presentó inhibición frente a bacterias Gram positivas como:

*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, al igual que *Croton thurifer* que también obtuvo actividad frente a *Bacillus subtilis* (Lui *et al.*, 2014). Sin embargo estudios realizados por Romero (2015), de actividad antibacteriana en la especie *Croton elegans* frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aureginosa* evidenciaron que no hubo actividad frente a las cepas mencionadas. Por lo tanto, las actividades antibacterianas de las especies del género *Croton* van a variar de una especie a otra debido a la diversidad química que presenta (Barrera *et al.*, 2016).

#### **Conclusiones**

En el presente estudio la mayoría de compuestos activos estuvo presentes en las tres plantas evaluadas; sin embargo, los metabolitos que se presentaron en cantidades abundantes fueron los flavonoides y taninos. La especie *Loxopterygium huasango* fue la que más presentó compuestos activos, obteniendo aparte de abundantes contenidos de flavonoides y fenoles, la presencia de alcaloides, quinonas y antraquinonas en abundancia, mientras que las saponinas solo estuvieron presentes en *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus*.

Los mayores contenidos de flavonoides totales se observaron en *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus* con  $995,42 \pm 3,16$  y  $190,50 \pm 0,83$  mg CE/g de extracto, y el mayor contenido de fenoles totales lo obtuvieron *Loxopterygium huasango* e *Hibiscus escobariae*, con  $314,72 \pm 1,91$  y  $12,24 \pm 0,22$  mg GAE/g de extracto. De acuerdo a los resultados obtenidos, *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus* fueron las que obtuvieron la mejor actividad antioxidante, por lo que podría usarse en un futuro para la elaboración de nuevos fármacos con capacidades antioxidantes.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de actividad antibacteriana, las especies *Hibiscus escobariae* y *Loxopterygium huasango* podrían considerarse como una nueva fuente natural para la elaboración de productos antibacterianos, sobretudo la especie *Loxopterygium huasango* que mostró el mejor resultado contra todas las bacterias evaluadas, presentando concentraciones mínimas inhibitorias de 2,5 a 5 mg/mL; mientras que *Hibiscus escobariae* solo presentó actividad frente a *B. subtilis* y *L. monocytogenes* causantes de enfermedades infecciosas. Las especies *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus* fueron las que obtuvieron la mejor actividad antioxidante por lo que podría usarse en un futuro para la elaboración de nuevos fármacos con capacidades antioxidantes.

#### **Referencias**

Aguirre, Z. 2012. *Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Guía dendrológica para su identificación y caracterización*. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/FAO - Finlandia. Quito, Ecuador.

- 140 p
- Alzoreky, N., Nakahara, K. 2003. *Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia*. International Journal of Food Microbiology Universidad de Buenos Aires.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck M. 1996. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method*. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493.
- Buchholz, T., Metzger, T., 2016. *Medicinal plants traditionally used for treatment of obesity and diabetes mellitus-screening for pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase inhibition*. *Phytother.*
- Carretera, M. y Ortega, T. 2017. *Propiedades terapéuticas de hibisco*. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Chung, P., Chung, L., Ngeow, Y., Goh, S., Imiyabir, Z. 2004. *Antimicrobial activities of Malaysian plant species*. Pharmaceutical Biology.
- Dominguez, X. 1979. *Métodos de Investigación fitoquímica* Editorial Limusa. México.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. 2003. *Resistencia bacteriana*. Revista Cubana de Medicina Militar.
- Garrido, G., González, D., Lemus, Y., García, D., Lodeo, L., Quintero, G., Delporste, C., Nunes, A., Delgado, R. 2004. *In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of Mangifera indica L. extract (VIMANG®)* Pharmacol. Res. Volume 50.
- Gomes, M., Da Costa, R., Moreira, R., Pegas, J., Lígia, L., Saffi, J. 2010 *Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus*. Laboratório de Genética Toxicológica. Food Chemistry 118.
- Lee, J., Koo, N., Min, 2004. *Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals*. Comp Rev Food Sci Saf
- Medina, E., Sumaya, M., Machuca, L., Sánchez-Herrera, R., Balois y Jiménez. 2013. *Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 Variedades de jamaica (Hibiscus Sabdariffa L.) en función de fenólicos y antocianinas totales*. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias 22: 41-44.
- Medina, E., Sumaya, M., Machuca, L., Sánchez-Herrera, R., Balois y Jiménez. 2013. *Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 Variedades de jamaica (Hibiscus Sabdariffa L.) en función de fenólicos y antocianinas totales*. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias 22: 41-44.
- Ordoñez, L. 2016. *Evaluación antibacteriana de los extractos de Croton elegans frente a Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus mutans, patógenos de enfermedades respiratorias*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito
- Paredes, O., Cervantes, M., Vigna, M., Hernández, T., 2010. *Berries improving human health and healthy aging and promoting quality life*. Plant Foods human Nutr.
- Pham-Huy, 2008. *Free radicals, antioxidants in disease and health*. Int. J Biomed Sci.
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, M., Ovando-Cruz, R., Arteaga-Garibay M., Martínez-Peña, D. 2015. *Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) con cálices de colores diversos*. Agrociencia 49: 277-290.
- Salatino, A., Salatino, M., Negri, G. 2007. *Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae)*. J. Braz. Chem.
- Serban, C., Sahebkar, A., Ursoniu, S. 2015. *Effect of sour tea (Hibiscus sabdariffa L.) on arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. J Hypertens
- Sulaiman, F., Kazeem, A., Waheed, S., Temowo, I., Azeez, F., Zubair, T., Adeyemi, A., Nyang, O. Adeyemi. 2014. *Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of Allium sativum, Hibiscus sabdariffa and Zingiber officinale in Wistar rats*. Journal of Taibah University for Science 8: 315-322.
- Suzimone, C., Juceni, P. 2006. *Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae*. Departamento de química exacta, Universidad Estatal del Suroeste de Nahia, Brasil.
- Vivas, L., Wagner, M., Ricco, R. 2014. *Control de calidad farmacobotánico y fitoquímico de Hibiscus sabdariffa L.* Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Williams, W., Cuvelier, M., Berset C., 1995 *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT Food Sci Technol.
- Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, W. 1999. *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. Food Chemistry.
- Sharapin, N. 2000. *Cualidades de materia prima para productos fitofarmacéuticos*. Conferencia en el I Curso Iberoamericano de Fitoterapia Clínica. Guatemala.
- Reyes, A., Salinas, Y., Ovando, M., Arteaga, R., Martínez, M. 2015. *Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) con cálices de colores diversos*. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.
- Sanchez, G., Giuliani, A., Núñez, J., Davison, G., León, O. 2000. *Protective effects of Mangifera indica L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice*. Pharmacol. Res. 6:565-73
- Vasudeva, N., Sharma, S. 2008 *Biologically Active Compounds from the Genus Hibiscus*. Pharmaceutical Biology, 46:3, 145-153
- Bussman, W., Glenn, A., Meyer, K., Rothrock, A. 2009. *Phyto-Chemical Analysis of Peruvian Medicinal Plants*. Brown Center, Missouri Botanical Garden, P.O. Box 299, St. Louis
- Prasad, M. 2014. *In vitro Phytochemical Analysis and Antioxidant Studies of Hibiscus Species*. Department of Biotechnology, Sanganomics Research Labs, Domlur Layout, Bangalore, India
- Villareal, M., Cardoso, A., Ortíz, A., Sharma, A. 2014. *Biotechnology para producir medicina de plantas mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México. Revista Digital universitaria.
- Altamirano, J. 2015. *Evaluación de la Actividad antioxidante de cuatro especies del género Croton*. Universidad Central del Ecuador. Quito
- Barrera, A., Gómez, D., Castiblanco, F., 2016. *Importancia medicinal del género Croton (euphorbiaceae)*. Revista cubana de plantas medicinales. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.
- Atto, V., Pierre, K., Monteomo, G., Adeoti, M. 2016. *Phytochemical Screening of Sclerocarya birrea (Anacardiaceae) and Khaya senegalensis (Meliaceae), Antidiabetic Plants*. International Journal of Pharmacy and Chemistry. Vol.2.
- López, M. 2010. *Determinación de la actividad biológica de flavonoides y su identificación por electroforesis capilar en plantas medicinales*. Instituto Técnico Nacional de México.
- Wen, H.X, Wei, Y.L, Qian, L. 2018. *Chemical Constituents from Croton Species and Their Biological Activities*. Key Laboratory for Forest Resources. Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China.