

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES**

Tesis previa a la obtención del título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS  
(ALCOHÓLICO Y ACUOSO) DE LAS HOJAS DE FICUS CITRIFOLIA Y  
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS POLIFENOLES.**

**AUTORES:**

**CRISTIAN DAVID ALDANA PÉREZ**

**LORENA ELIZABETH GUAYASAMÍN PÉREZ**

**DIRECTOR:**

**PACO NORIEGA**

**Quito, enero del 2014**

## **DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DE TRABAJO DE GRADO**

Nosotros autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, enero del 2014

---

Cristian David Aldana Pérez

CC: 0503153918

---

Lorena Elizabeth Guayasamín Pérez.

CC: 1717481442

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a la UPS, a nuestro querido director de tesis Msc. Paco Noriega por el apoyo brindado y a nuestros profesores, quienes compartieron sus conocimientos con nosotros durante todos estos años.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	2
<b>ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>1.1 Justificación</b> .....	2
<b>1.2 Hipótesis</b> .....	3
<b>1.2.1 Hipótesis</b> .....	3
<b>1.2.2 Hipótesis Nula (Ho)</b> .....	3
<b>1.3 Objetivos</b> .....	3
<b>1.3.1 Objetivo General</b> .....	3
<b>1.3.2 Objetivos Específicos</b> .....	3
CAPÍTULO II.....	4
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	4
<b>2.1 Familia Moraceae</b> .....	4
<b>2.1.1 Características</b> .....	4
<b>2.1.2 Género <i>Ficus</i></b> .....	6
<b>2.1.2.1 Características</b> .....	6
<b>2.1.3 <i>Ficus citrifolia</i>. Mill.</b> .....	7
<b>2.1.3.1 Características</b> .....	7
<b>2.2 Métodos de análisis de las drogas</b> .....	8
<b>2.2.1 Selección de materia prima</b> .....	8
<b>2.2.2 Determinación de materias extrañas</b> .....	8
<b>2.2.3 Determinación de microorganismos</b> .....	9
<b>2.2.4 Determinación de cenizas</b> .....	9
<b>2.2.5 Determinación de agua (humedad residual)</b> .....	9

2.2.6	Material extraíble con disolventes .....	9
2.3	Generalidades de los antioxidantes .....	9
2.3.1	Características de los antioxidantes.....	9
2.3.1.1	Sistema enzimático.....	10
2.3.1.2	Sistema no enzimático .....	10
2.3.1.3	Sistema reparador de moléculas.....	10
2.3.2	Fuentes naturales de los antioxidantes .....	11
2.3.3	Estrés oxidativo.....	11
2.4	Estudio fitoquímico de polifenoles .....	13
2.4.1	Cuantificación de fenoles totales .....	13
2.4.1.1	Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu 13	
2.4.2	Flavonoides.....	14
2.4.2.1	Clasificación de los flavonoides .....	15
2.4.2.2	Cuantificación de flavonoides totales.....	16
2.5	Métodos de evaluación de la actividad antioxidante .....	16
2.5.1	DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo) .....	16
2.5.2	ABTS (ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico) .....	17
2.5.3	Cromatografía .....	17
2.5.3.1	Cromatografía de capa fina (TLC) .....	17
CAPÍTULO III.....		20
MARCO METODOLÓGICO.....		20
3.1	Recolección y preparación del material vegetal.....	20
3.2	Métodos de análisis de drogas.....	20
3.2.1	Determinación de Materias extrañas.....	20

3.2.2	Determinación de microorganismos .....	21
3.2.3	Determinación de Cenizas .....	22
3.2.4	Determinación de agua (humedad residual). .....	24
3.2.5	Determinación de sustancias extraíbles.....	26
3.3	Elaboración de extractos .....	27
3.4	Estudio fitoquímico de polifenoles .....	27
3.4.1	Determinación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).....	27
3.4.2	Determinación de Flavonoides totales .....	28
3.5	Actividad antioxidante .....	29
3.5.1	Método DPPH .....	29
3.5.2	Método ABTS. ....	32
3.6	Cromatografía.....	34
3.6.1	Cromatografía de capa fina (TLC).....	34
CAPÍTULO IV .....		37
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>37</b>
4.1	Análisis de las drogas.....	37
4.1.1	Ensayo de materias extrañas .....	37
4.1.2	Determinación de microorganismos .....	37
4.1.3	Determinación de cenizas .....	37
4.1.4	Determinación del agua (humedad residual) .....	38
4.1.5	Determinación de sustancias extraíbles.....	38
4.2	Estudio fitoquímico de los polifenoles.....	38
4.2.1	Determinación de Fenoles Totales (FC) .....	38
4.2.2	Determinación de Flavonoides Totales.....	40
4.3	Determinación de Actividad Antioxidante .....	41

4.3.1	Método DPPH .....	41
4.3.2	Método ABTS .....	50
4.4	Cromatografía Capa fina .....	59
4.5	Análisis estadístico .....	63
4.5.1	DPPH .....	64
4.5.2	ABTS.....	65
4.5.3	Fenoles Totales.....	66
4.5.4	Flavonoides Totales .....	67
CONCLUSIONES.....		69
RECOMENDACIONES.....		70
LISTA DE REFERENCIAS .....		71
ANEXOS .....		77

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Curva de calibración para fenoles totales .....	28
Tabla 2. Curva de calibración para flavonoides totales .....	29
Tabla 3. Lecturas del antirradical DPPH.....	31
Tabla 4. Resumen de ensayos de análisis de la droga.....	37
Tabla 5. Fenoles totales en extractos de <i>Ficus citrifolia</i> y té verde.....	39
Tabla 6. Flavonoides totales de extractos de <i>Ficus citrifolia</i> y té verde.....	40
Tabla 7. Actividad antirradical DPPH del extracto 50% alcohólico de té verde.....	42
Tabla 8. Actividad antirradical DPPH de la vitamina C.....	43
Tabla 9. Actividad antirradical DPPH del extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	44
Tabla 10. Actividad antirradical (DPPH) del extracto 50% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> ...	46
Tabla 11. Actividad antirradical (DPPH) del extracto 20% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> ...	47
Tabla 12. Actividad antirradical (DPPH) del extracto acuoso de <i>F. citrifolia</i> .....	48
Tabla 13. Actividad antirradical ABTS del extracto 50% alcohólico de té verde .....	51
Tabla 14. Actividad antirradical ABTS de la vitamina C .....	52
Tabla 15. Actividad antirradical (ABTS) del extracto alcohólico al 80% de <i>F. citrifolia</i> .....	54
Tabla 16. Actividad antirradical ABTS del extracto alcohólico al 50% de <i>F. citrifolia</i> ..	55
Tabla 17. Actividad antirradical (ABTS) del extracto alcohólico al 20% de <i>F. citrifolia</i> .....	56
Tabla 18. Actividad antirradical (ABTS) del extracto acuoso de <i>F. citrifolia</i> .....	57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparación de la cantidad de fenoles totales entre los extractos de <i>F. citrifolia</i> y té verde. ....	39
Gráfico 2. Comparación de la cantidad de flavonoides totales entre los extractos de <i>F. citrifolia</i> y té verde. ....	41
Gráfico 3. Porcentaje de inhibición de DPPH del extracto 50% alcohólico de té verde. ....	43
Gráfico 4. Porcentaje de inhibición de antirradical DPPH de vitamina C.....	44
Gráfico 5. Porcentaje de inhibición antirradical DPPH del extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	45
Gráfico 6. Porcentaje de inhibición antirradical DPPH en extracto 50% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	46
Gráfico 7. Porcentaje de inhibición antirradical DPPH en extracto 20% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	47
Gráfico 8. Porcentaje de inhibición antirradical DPPH del extracto acuoso de <i>F. citrifolia</i> .....	49
Gráfico 9. Valores de IC <sub>50</sub> de la vitamina C y de los extractos de <i>F. citrifolia</i> y Té verde. ....	50
Gráfico 10. Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 50% alcohólico de té verde...52	52
Gráfico 11. Porcentaje de inhibición ABTS por Vitamina C.....	53
Gráfico 12. Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	54
Gráfico 13. Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 50% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	55
Gráfico 14. Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 20% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> .....	56
Gráfico 15. Porcentaje de inhibición ABTS por extracto acuoso de <i>F. citrifolia</i> .....	58
Gráfico 16. Valores de IC <sub>50</sub> de vitamina C y los extractos de <i>F. citrifolia</i> y té verde. ....	59
Gráfico 17. Placa cromatográfica del extracto alcohólico al 80% de <i>F. citrifolia</i> revelada con cloruro de aluminio y observada a 366 nm. ....	60
Gráfico 18. Placa cromatográfica del extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> rociada con DPPH. ....	61

Gráfico 19. Placa cromatográfica del extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i> un minuto después de ser rociada con DPPH.....	62
Gráfico 20. Tabla de datos de IC <sub>50</sub> de DPPH y ABTS en el programa InfoStat.....	63
Gráfico 21. Tabla de datos de fenoles y flavonoides totales en el programa InfoStat.....	64
Gráfico 22 Cuadro de análisis de la varianza, método DPPH. ....	65
Gráfico 23 Cuadro de análisis de la varianza, método ABTS .....	66
Gráfico 24. Cuadro de análisis de varianza para fenoles totales.....	67
Gráfico 25. Cuadro de análisis de varianza para flavonoides totales.....	68

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación de materias extrañas. ....	21
Ecuación 2. Determinación de cenizas totales. ....	23
Ecuación 3. Determinación de cenizas solubles en agua. ....	24
Ecuación 4. Determinación de agua (humedad residual).....	25
Ecuación 5. Determinación de sustancias extraíbles.....	26
Ecuación 6. Porcentaje de inhibición del radical DPPH.....	31
Ecuación 7. Porcentaje de la capacidad antioxidante ABTS .....	34
Ecuación 8. Factor de retardo de una muestra .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detalles de las flores y fruto de <i>Ficus benghalensis</i> .....	5
Figura 2. Flavonoides, estructura básica y tipos. ....	16
Figura 3. Factor de retardo de una muestra.....	36

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Lista de abreviaturas.....	77
Anexo 2. Fotografía de la certificación de la planta <i>Ficus citrifolia</i> .....	78
Anexo 3. Fotografías de la recolección de la planta en Tulipe (Pichinhca).....	79
Anexo 4. Proceso del análisis de las drogas: materias extrañas.....	79
Anexo 5. Método de análisis de las drogas: análisis microbiológico .....	80
Anexo 6. Método de análisis de las drogas: cenizas .....	80
Anexo 7. Método de análisis de las drogas: agua residual (humedad) .....	81
Anexo 8. Método de análisis de las drogas: sólidos solubles .....	81
Anexo 9. Curva de calibración para fenoles totales con GAE (tabla y gráfico). .....	82
Anexo 10. Curva de calibración para flavonoides totales con hiperósido (tabla y gráfico) .....	82
Anexo 11. Radicales DPPH y ABTS .....	83
Anexo 12. Espectrofotómetro UV (marca Shimadzu y modelo UV mini 1240).....	84
Anexo 13. Cromatógrafo (marca CAMAG y modelo Linomat 5).....	84

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos fluidos, acuoso y alcohólicos al 20%, 50% y 80% de *Ficus citrifolia* mediante los ensayos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (2,2' Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico) y también se cuantificó los fenoles y flavonoides totales. En todos los ensayos se demostró valores significativos del extracto 80% alcohólico de *Ficus citrifolia* y muy cercanos a los obtenidos para el extracto 50% alcohólico de té verde (*Camellia sinensis*).

En el ensayo de captura de radical DPPH el valor de IC<sub>50</sub> más bajo fue para el extracto alcohólico al 80% con 380,366 µg/mL y el más alto fue para el extracto acuoso con 1299,218 µg/mL.

El ensayo de ABTS, el extracto alcohólico al 80% tuvo un valor de IC<sub>50</sub> más bajo con 9,786 µg/mL y el más alto fue para el extracto acuoso con 50,037 µg/mL.

Se cuantificó los fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, teniéndose valores expresados como equivalentes a mg de GAE/mL de extracto que van descendiendo desde 22,728 para el extracto alcohólico al 80% hasta 7,634 para el extracto acuoso.

La cantidad de flavonoides totales más alta fue de 9,198 del extracto 80% alcohólico y la más baja fue de 3,393 del extracto acuoso, cuyos valores se expresaron como equivalentes a mg de Hyp/mL de extracto.

La separación por TLC del extracto alcohólico al 80% mostró al menos ocho manchas coloridas correspondientes a flavonoides de los cuales, al menos cuatro poseen actividad antioxidante importante demostrada al decolorar instantáneamente una solución etanólica de DPPH al 0,5%.

## ABSTRACT

The antioxidant activity of the fluids extracts, watery, alcoholic 20%, 50% and 80%, of *Ficus citrifolia* was evaluated by the essays of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic acid), and also was quantified the total fenols and flavonoids. The *Ficus citrifolia* 80% alcoholic extract's values were significant for all of them and very closer to the 50% alcoholic extract of green tea (*Camellia sinensis*).

The lowest IC<sub>50</sub>'s value, for the radical scavenging DPPH, was 380,366 µg/mL of the 80% alcoholic extract and the highest values were of the watery extract with 1299,218 µg/mL.

In the ABTS method, the 80% alcoholic extract had a IC<sub>50</sub>'s lowest value with 9,786 µg/mL and the highest values were of the watery extract with 50,037 µg/mL.

The total fenols quantity was determined by the Folin-Ciocalteu method. The values were expressed as equivalents to mg of GAE/mL of extract which descend while 22,728 for the 80% alcoholic extract until 7,634 for the watery extract.

The highest total flavonoid's quantity was 9,198 of the 80% alcoholic extract and the lowest was 3,393 of the watery extract, which values were expressed as equivalents to mg of Hyp/mL of extract.

At the end a separation by TLC was done for the 80% alcoholic extract, make evidently at least eight colored marks matched to flavonoids of which ones, at least four get an important antioxidant activity showed by instantly discolor a ethanolic solution of 0,5% DPPH.

## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Kuskoski, 2004, pág. 691).

Badui (1999) menciona que los antioxidantes son compuestos químicos que tienen la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación, y Hwang (2003) puntualiza en grupos fitoquímicos como los tocoferoles y las isoflavonas.

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta (Benthath A, 2008, pág. 137); sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica (Wang J. y., 2002, pág. 4183).

Existen estudios serios sobre la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de varias especies vegetales, y en los pocos que se han hecho a especies del género *Ficus* se han tenido resultados significativos (Rajan, 2012, pág. 59). Sin embargo en nuestro país son muchas las especies que carecen de dichos estudios como es el caso de *Ficus citrifolia*, de la que únicamente se utiliza la madera ignorando otros potenciales usos por falta de estudios.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1 Justificación

Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales (Yanishleva-Maslarova N.V., 2001, pág. 119)

Gordon (2001) menciona que los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Estos pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios.

Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno (Gordon M., 2001, pág. 11).

En una investigación realizada de la corteza del género *Ficus* (*Ficus amplissima* Smith), se encontraron fenoles, contenido de taninos y flavonoides en el extracto de acetona, mostrando también actividad antioxidante (Rajan, 2012, pág. 64). En otra se encontró que el fruto del higo (*Ficus carica*) tiene propiedad antioxidante elevada (Solomon A, 2006, pág. 7722).

Con estos antecedentes, se podría evaluar a *Ficus citrifolia* ya que de dicha planta se utiliza únicamente la madera y el resto (en especial las hojas) se desecha, siendo que puede tener potenciales propiedades farmacológicas interesantes como lo es una buena actividad antioxidante y que, podría usarse para la obtención de un producto útil para el ser humano.

## **1.2 Hipótesis**

### **1.2.1 Hipótesis**

Los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *Ficus citrifolia* poseen una cantidad de polifenoles y actividad antioxidante similares.

### **1.2.2 Hipótesis Nula (H<sub>0</sub>)**

Los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *Ficus citrifolia* no poseen una cantidad de polifenoles y actividad antioxidante similares.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Ficus citrifolia* y la caracterización química de sus polifenoles.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Ficus citrifolia* por los métodos DPPH y ABTS.
- Iniciar la caracterización química de los polifenoles de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Ficus citrifolia* mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides totales por el método Folin-Ciocalteu.
- Realizar un TLC al extracto que presente mayor actividad antioxidante para visualizar las fracciones de flavonoides que presenten dicha actividad mediante la aspersion de una solución de DPPH.
- Comparar los valores obtenidos en la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Ficus citrifolia* mediante análisis de varianza (ANOVA).

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

El presente capítulo aborda los principales aspectos relacionados con la familia Moraceae, el género *Ficus* y sus estudios previos. Además se señalan conceptos claves de los radicales libres, su origen, factores que los generan y daños que causan en los sistemas biológicos. También se describen algunas de las propiedades de los antioxidantes y la relación que guardan con su estructura, así como el fundamento de algunas de las metodologías para la determinación de la actividad antioxidante.

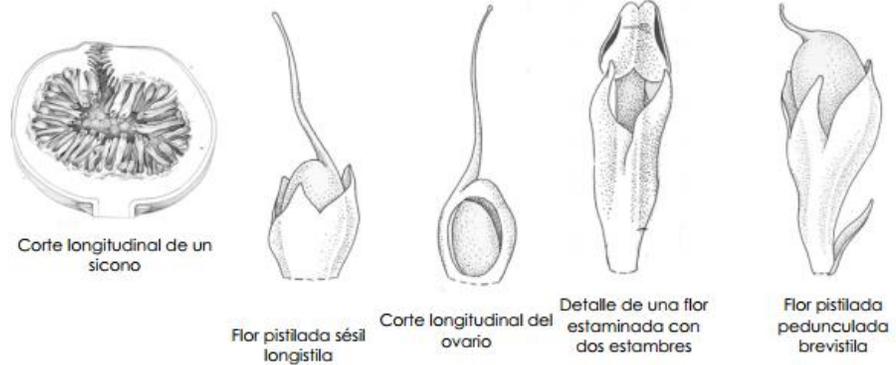
#### **2.1 Familia Moraceae**

##### **2.1.1 Características**

Esta familia posee unas 2.500 especies y 50 a 55 géneros divididos en cinco tribus, tropicales en su mayoría y muchas con gran importancia económica (Boelcke, 1987, pág. 58).

Vázquez (1981) afirma que son árboles, arbustos o plantas herbáceas, erguidas o trepadoras, a menudo epífitos con latex. Sus hojas son alternas, raramente opuestas, simples, enteras, dentadas o lobuladas, glabras o pubescentes, coriáceas o papiráceas, pecioladas. Sus flores son muy pequeñas, dioicas o monoicas, dispuestas en espigas o siconos. El perianto con 4 - 5 pétalos soldados, a veces ausente. Los estambres isostémonos, cuatro o en menor número que los tépalos; filamentos libres, anteras bitecas, versátiles de dehiscencia longitudinal. Su gineceo posee ovario súpero a ínfero, en principio bicarpelar, pero generalmente unilocular por aborto de uno; un óvulo generalmente anátropo y péndulo; estilos filiformes y generalmente dos con el mismo número de estigmas. Su fruto en forma de cápsula, en ciertas especies formando una infrutescencia globosa y por último su semilla generalmente endospermada y con embrión curvo.

**Figura 1.** Detalles de las flores y fruto de *Ficus benghalensis*



**Fuente:** Boelcke, 1987

Rotman (1987) menciona su gran interés etnobotánico desde la más remota antigüedad tales como:

**Ornamental:** *Ficus elastica*, *Ficus benghalensis* e incluso *Ficus carica*, así como diversos géneros de *Morus*, son usados en parques y jardines como decoración por la hermosa vistosidad de sus hojas y su profusa sombra en muchos casos.

**Medicinal:** El látex que presentan todas las plantas de esta familia tiene propiedades antihelmínticas, o lo que es lo mismo, propiedades para tratar infecciones por gusanos intestinales. También, este látex se ha usado tradicionalmente para tratar verrugas. Además se pueden usar los higos de *Ficus carica* para preparar jarabes laxantes.

**Gastronómico:** Los higos y brevas de *Ficus carica*, y las moras de *Morus alba* y *M. nigra* fundamentalmente pero también otras especies de ambos géneros. Muchas de las especies cultivadas de *Ficus carica* son partenocárpicas. En latitudes templadas, se producen brevas de las yemas del año anterior en los meses de junio-julio, y los higos como segunda cosecha de agosto a septiembre. Puede haber una tercera producción en el año, que se situaría en los meses otoñales.

Obtención de Caucho: Sobre todo de la especie *Ficus elástica*

Se usan las hojas de *Morus* para alimentar gusanos de seda (*Bombyx mori*).

Las fibras de *Broussonetia papyrifera*, la “morera de papel” se usada en el este de Asia para hacer ropa.

Como veneno: El látex de *Antiaris toxicaria* (sur de Asia) es usado por los nativos para untar flechas, puesto que es altamente tóxico.

### **Distribución y Hábitat**

Familia originaria de las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. La mayoría de los individuos de *Ficus luschnathiana* comienza su vida como epífitos, emitiendo posteriormente poderosas prolongaciones hacia el piso, hasta arraigarse directamente al suelo. El verdadero tronco, con sus hojas y sus yemas, se desarrollan arriba del soporte. También crecen en edificaciones abandonadas, a partir de tierra acumulada en las grietas. Cuando se lo cultiva es estrictamente terrestre (Hill, 1965, pág. 615).

## **2.1.2 Género *Ficus***

### **2.1.2.1 Características**

En el mundo, el género *Ficus* contiene alrededor de 750 especies aceptadas de árboles, arbustos y trepadoras de la familia Moraceae, tribu mono genérica Ficeae, oriundas de la Zona Intertropical, con algunas de ellas distribuidas por las regiones templadas. La mayoría son perennes, excepto las que vegetan en latitudes no tropicales y zonas con una larga estación seca. En Ecuador han sido encontradas 70 especies (Harling, 2009, pág. 76).

Una de las características de las especies de este género es la secreción lechosa llamada látex que segregan al cortar o herir cualquier parte de la planta. Pero el más característico es el tipo muy particular de

inflorescencia que se parece más a un fruto que a unas flores habituales (Publicorb, 2008, pág. 1).

La especie *Ficus carica*, la higuera común, pertenece a este género. Su falso fruto, muy comercializado, es el higo y la breva. Los frutos de otras muchas especies también son comestibles, aunque no se consumen extensamente (Bravo, 1998, pág. 320).

### 2.1.3 *Ficus citrifolia*. Mill.

#### 2.1.3.1 Características

**Nombre común:** Matapalo, higuera

Es un árbol de hasta 20 m de altura (raras veces alcanzan hasta 40 m). Tienen ramitas de hoja 2 - 8 mm de espesor, ligeramente angulares, blanco-pubérulas a glabras; peridermis descamante o persistente. Láminas (sub) coriáceas, oblongas a elípticas a (sub) ovadas o subobovadas, (5 - 24 cm x 3 - 13 cm), ápice acuminado, base obtusa a cordadas (o cuneiforme) (Cao, 1997, pág. 752).

Superficies blanco pubérulas en las venas principales o sólo en la nervadura central o glabras; venas laterales (8 - 16 pares, a menudo o a veces ahorquillado lejos del margen), el par basal de hasta 1/10 – 1/16 la duración de la lámina, ramificado o no ramificado, la venación terciaria radiculada plana; pecíolo 2 - 10 cm de largo, 1 - 2 mm de espesor, glabro (o blanco) pubérulas, la epidermis persistente (o descamante); estípulas (0,5 - 3) cm de largo, glabras (o blanco) pubérulas caducas (Harling, 2009, pág. 77).

Presentan higos axilares o también justo debajo de las hojas, con un pedúnculo 0,2 - 0,8 cm de largo (o subsésiles); brácteas basales 1 - 4 mm de largo, glabros fuera y por dentro; globosas receptáculo para obovoide (o para subturbinado), 0,6 - 2 cm de diámetro cuando está seco, glabro o

con escasa densidad blanco pubérulas (Delmas, 2003, pág. 41486), verde (o rojo) a su madurez, ápice convexo, casi plana; ostiolo 2 - 3 (- 3,5) mm de diámetro (Pannala, 2001, pág. 1162), plana a ligeramente prominente, a veces ligeramente umbonado, cerrado por 2 o 3 brácteas superiores ostiolar: pelos internos ausentes (Harling, 2009, pág. 78).

## **2.2 Métodos de análisis de las drogas**

A *Ficus citrifolia* se la usa como fuente de madera, pero no se le da un uso medicinal y no se tiene información básica de la calidad de la droga, en este caso de las hojas. Migdalia (2002) y Bisset (1994) hacen una recopilación de varios estudios con el objeto de evaluar o valorar las drogas vegetales, identificarlas y determinar su calidad y pureza, lo cual se traduce en su valor intrínseco, o lo que es lo mismo, en la cantidad de principios activos presentes en ella. De éstos hemos seleccionado los siguientes:

### **2.2.1 Selección de materia prima**

Bisset, (1994) menciona que si el lote de la droga, está integrado por 5 o menos sacos o paquetes (cada saco o paquete pesa 1 kg aproximadamente), se inspeccionan todos, se escogerán aleatoriamente el 10 % de ellos.

Se mezclan tres muestras (de la parte superior, media e inferior) y se divide en cuatro partes, formando un cuadrado y se seleccionan las de dos lados opuestos, las cuales se vuelven a mezclar bien hasta obtener la cantidad de muestra para los ensayos.

### **2.2.2 Determinación de materias extrañas**

Los límites para las materias extrañas, se establecen en las monografías o especificaciones de calidad de cada droga en particular.

La presencia de cualquier otro contaminante, en especial animal o microbiano, o el no cumplimiento de los parámetros establecidos para la droga, hace que la misma sea declarada no apta para el consumo (Bruneton, 2001, pág. 13).

### **2.2.3 Determinación de microorganismos**

Se toma en cuenta los límites dependiendo del uso del material. Los límites son dados para drogas no tratadas, cosechados bajo condiciones higiénicas aceptables. Por gramo:

Máximo  $10^4$  ufc. de *Escherichia coli* (Evans, 2011, pág. 10).

### **2.2.4 Determinación de cenizas**

La cenizas el residuo que queda después de la ignición de una droga (Palomino, 2001, pág. 6).

### **2.2.5 Determinación de agua (Humedad residual)**

Los límites de agua establecidos en la Farmacopea para las drogas, oscila entre un 8 y un 14 % con pocas excepciones, correspondiendo los valores más altos con la humedad de cortezas, tallos y raíces (Migdalia, 2002, pág. 10).

### **2.2.6 Material extraíble con disolventes**

Cuando no existen métodos adecuados para valorar los principios activos de una droga mediante métodos físico – químicos, se determina la cantidad de materia extraíble con agua, alcohol, éter o disolventes orgánicos (Bruneton, 2001, pág. 13).

## **2.3 Generalidades de los antioxidantes**

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Ramos, 2008, pág. 1).

### **2.3.1 Características de los antioxidantes**

Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de oxidarse rápidamente por lo que previene o detiene una cadena de propagación oxidativa, estabilizando el radical generado y la regeneración del antioxidante

radicalario ayudando a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990, pág. 273).

En un ambiente aerobio, los organismos utilizan sistemas antioxidantes como mecanismos de defensa a nivel fisiológico y bioquímico. A nivel fisiológico destaca el sistema microvascular que mantiene los niveles de O<sub>2</sub> en los tejidos, mientras que a nivel bioquímico, dicha defensa puede ser enzimática o no enzimática, así como ser un sistema reparador de moléculas (Salas, 2007, pág. 1).

#### **2.3.1.1 Sistema enzimático**

Como ejemplos se cita la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y DT-diaforasa. El sistema enzimático es la primera defensa antioxidante y se origina al interior del organismo. Éste actúa de dos maneras: evita la formación de radicales libres a partir de otras moléculas, o convierte los radicales libres existentes en moléculas menos peligrosas antes de que reaccionen dañando a otras moléculas vecinas (Cadena, 1999, pág. 1234).

#### **2.3.1.2 Sistema no enzimático**

Constituyen la segunda defensa antioxidante y corresponde a una serie de compuestos como: β-caroteno, ceruloplasmina, glutatión reducido (GSH), taurina, ácido úrico, vitaminas C y E, entre otros que normalmente se obtienen de la dieta (Cadena, 1999, pág. 1235).

#### **2.3.1.3 Sistema reparador de moléculas**

Se clasifican en:

**Directo:** Reduce los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas mediante enzimas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

**Indirecto:** Se reconoce el daño molecular y se lo repara o degrada, para luego sintetizar la parte eliminada. Este proceso se lleva a cabo tanto en proteínas oxidadas y en peróxidos lipídicos de cadenas hidrocarbonadas, así como en las oxidaciones del ADN y ARN (Chipault, 1962, pág. 479).

### **2.3.2 Fuentes naturales de los antioxidantes**

La fuente de antioxidantes más importante de la naturaleza lo constituyen los vegetales, frutas y verduras, en especial aquellas con altos contenidos de polifenoles, que poseen características biológicas extensas entre las cuales se encuentra el secuestro de radicales libres (Aquino R., 2001, pág. 1021).

Se han realizado numerosos estudios acerca de los polifenoles y especialmente los flavonoides, pero la propiedad que despierta mayor interés es su actividad antioxidante, debido a que en su estructura química contiene un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que reaccionan con los radicales libres (Middleton E. Jr., 1994, pág. 619).

El número de polifenoles naturales se ha estimado en más de un millón, porque debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinados con un ácido orgánico, un azúcar o formando polímeros de manera que sus diferentes enlaces generan una gran variedad de compuestos. Sin embargo, la bioactividad se atribuye al fragmento aglicona no al azúcar (Sakakibara, 2003, pág. 574).

### **2.3.3 Estrés oxidativo**

Pese a que el oxígeno juega un papel determinante para la vida aerobia, al permitir el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular, también representa un peligro potencial para la misma debido a sus características químicas que promueven la formación de intermediarios parcialmente reducidos y altamente reactivos conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Davis, 1995, pág. 9).

En los orbitales, los electrones se mantienen apareados con un espín particular, pero cuando se tienen electrones desapareados se pierde la estabilidad dotando de reactividad a la molécula, debido a que dichos electrones tratarán de robar electrones de otras moléculas para estabilizarse. Las ROS pertenecen a este tipo de moléculas conocidas por ser precursores de radicales o también llamados radicales libres (RL). El principal radical libre es el oxígeno y es debido a que posee dos electrones desapareados (Salas, 2007, pág. 1).

Entre los radicales libres se encuentran los hidróxidos ( $\text{OH}^\cdot$ ), superóxidos ( $\text{O}_2^\cdot$ ) y otras especies oxigenadas como los peróxidos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que actúan retirando oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos (Olson, 1996, pág. 1). Los precursores de estos radicales libres pueden ser exógenos o endógenos, dependiendo de si se generan en el metabolismo interior de la célula (cadena respiratoria, células fagocitarias, auto oxidación de compuestos de carbono, etc.) o de si proceden de fuentes externas tales como la contaminación ambiental, solventes, drogas, humo, entre otras (Bomman, 1999, pág. 394).

Independientemente de su fuente, los radicales libres constituyen un peligro potencial para los seres vivos, ya que afectan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos e incluso llegan a provocar muerte celular. Como respuesta al daño causado, el organismo se defiende contrarrestando la oxidación mediante el accionar de moléculas antioxidantes, pero si la oxidación no es detenida se cae en un proceso llamado estrés oxidativo (Davis, 1995, pág. 11).

Como consecuencia del estrés oxidativo se han detectado varios trastornos en los seres vivos como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, diabetes, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento celular, etc. (Rice-Evans C., 1995, págs. 7-8).

## **2.4 Estudio fitoquímico de polifenoles**

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención (Kim YJ, 1997, pág. 26).

### **2.4.1 Cuantificación de fenoles totales**

La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante (Roginsky V., 2005, pág. 243).

Dentro de las técnicas analíticas para la cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos se encuentran las técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TCL), la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC) (Escarpa A, 2001, pág. 58), y también se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Martínez-Valverde I., 2000, pág. 5).

#### **2.4.1.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**

Entre los métodos para la medición de fenoles totales se encuentra el de FC, uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales. Esta prueba consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5 - 10 %, acuoso). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno  $\text{MoO}$ , este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia de uv/vis debido a que absorbe a una longitud de 750 nm (Roginsky V., 2005, pág. 250).

El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico. La prueba de FC es similar a la de ABTS ya que ambos

métodos ayudan a la determinación de polifenoles y monofenoles. La ventaja del método de FC sobre ABTS es que FC está relacionado con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción, no a una disminución de la absorbancia como ocurre con la prueba de ABTS (Kim, 2002, pág. 3714). Otra de las ventajas es que ésta prueba (FC) no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis. Aunque, si bien el método de FC no está relacionado con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimar esta actividad antioxidante en alimentos, con la excepción de que la muestra no contenga una cantidad de proteínas significativa. En la literatura se pueden encontrar diversos ejemplos de la aplicación del método de FC con respecto a productos alimenticios como es el caso del vino rojo y blanco, té y jugos (Andriambeloson, 1998, pág. 2326).

#### **2.4.2 Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto de carbono C6 - C3 - C6. Se denominan flavonoides a varias clases de sustancias naturales que están compuestos de dos anillos aromáticos (A y B), unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (C); que se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales (Troncoso, 2003, pág. 42).

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro; y flavonoide, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos; además de ser parte del árbol *ginkgo biloba* y la *Camellia sinensis* (té verde). Las principales familias que contienen flavonoides son: rutáceas, poligonáceas (Roberts, 2003, pág. 1487).

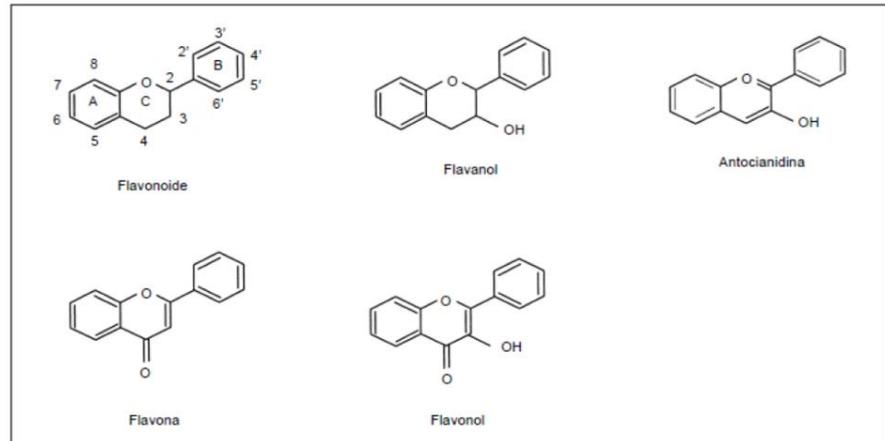
Pinelo, (2004) menciona que la mayoría de flavonoides poseen nombres triviales con la terminación INA u OL. Estos nombres les han sido asignados por los investigadores que los han ido descubriendo uno a uno en la naturaleza. Hasta ahora hemos visto aspectos relacionados con la estructura simple de los flavonoides, sin embargo dentro de las plantas los estudios han mostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glicósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina agliconas flavonoides (Fogliano, 1999, pág. 1035).

#### **2.4.2.1 Clasificación de los flavonoides**

Moreno, (2006) Menciona que en función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- 1) Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- 2) Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- 3) Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- 4) Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- 5) Chalconas: con el anillo C abierto
- 6) Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3 (3 fenil y cromo)

**Figura 2.** Flavonoides, estructura básica y tipos.



Fuente: Ávila, Z. G. (2001).

#### 2.4.2.2 Cuantificación de flavonoides totales

Para la identificación de flavonoides se utilizan reacciones de coloración; como las que utilizan tricloruro de hierro, tricloruro de azufre y tricloruro de aluminio; estas reacciones forman complejos que presentan absorbancia en el espectro ultravioleta por lo que pueden ser identificadas mediante la técnica de espectrofotometría UV-visible. Además existen reacciones de color específicas para determinar el tipo de flavonoide al que pertenece y reacciones de color para comprobar la existencia de sustituyentes en la posición orto (McMurry, 2001, pág. 336).

### 2.5 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

#### 2.5.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo)

El fundamento del método desarrollado por Brand-Willams, (1995), DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 20 mg/L (Scartezzini, 2006, pág. 114).

### **2.5.2 ABTS (ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico)**

Éste método se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del ABTS (3,8 mg/mL) con 88 µL de persulfato potásico (37,5 mg/mL) incubados a temperatura ambiente (25 °C) y en la oscuridad durante 16 horas.

Una vez formado el radical ABTS se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre  $0,70 \pm 0,1$  a 754 nm (Miller, 1993, pág. 407).

### **2.5.3 Cromatografía**

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor) (Abbott, 1970, pág. 5).

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido (Ávila, 2001, pág. 1).

#### **2.5.3.1 Cromatografía de capa fina (TLC)**

En este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo manchas de los componentes (Fessenden, 1993, pág. 35).

En la cromatografía en capa fina (TLC), el grado de elución de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado (Arnao, 2000, pág. 419).

El adsorbente se coloca en forma de una capa delgada adherida sobre un soporte rígido, que pueden ser placas de vidrio, aluminio o poliéster. Los tamaños de la placa para TLC convencional son: 20 x 20; 10 x 20 y 5 x 2 cm (Dolabela, 1997, pág. 130).

Hay adsorbentes que contienen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos, se requerirán otras técnicas de revelado (Imeh, 2002, pág. 6305).

### **Eluyentes más comunes para TLC**

Stewart, (2003) hace mención de los eluyentes más comunes que son: Éter de petróleo, cloruro de metileno, N-hexano, acetato de etilo, ciclohexano, acetona, tolueno, *iso*-propanol, dietil-éter, etanol, t-butil-éter, metanol, cloroformo, ácido acético.

### **Reveladores más comunes para TLC**

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante:

- Luz UV: si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F<sub>254</sub> ó F<sub>366</sub>), el número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado.
- La introducción de la placa en vapores de yodo.

El rocío con una solución de agua/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (dentro de un compartimiento especialmente protegido y bajo una campana de

extracción de gases). Después calentar intensamente, por ejemplo, con un mechero, hasta carbonizar los compuestos (Hammond, 1999, pág. 25).

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Recolección y preparación del material vegetal

La recolección de las hojas se realizó en la zona de Tulipe (Latitud: 00°05'00"N, Longitud: 78°47'00"W), el 1 de Mayo del 2013 al medio día. La identificación del material se realizó por el doctor Carlos E. Cerón MSC director AD-HONOREM del Herbario Alfredo Paredes (QAP) ubicado en la Universidad Central del Ecuador. Una muestra de la especie se depositó en el herbario "UPS".

El material fue lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y luego en agua corriente, secado al sol y sometido a molienda.

#### 3.2 Métodos de análisis de drogas

##### 3.2.1 Determinación de Materias extrañas.

###### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

Placas petri, balanza analítica (marca: Mettler Toledo, modelo: ML204/01) y lupa o microscopio estereoscópico.

###### **Epígrafe A. Peso de la muestra**

Para este ensayo se utilizó 100g de hojas secas y trituradas.

###### **Epígrafe B. Orden de ensayos**

Determinamos partes de otras plantas y mezclas minerales (polvo, piedra, etc.)

###### **Procedimiento**

Migdalia (2002) menciona que teniendo en cuenta el peso de la droga señalado en el epígrafe A; proceda a la separación manual de las partes señaladas en el epígrafe B con la ayuda de una pinza o medio adecuado. Una vez concluido

pese cada una de las partes por separado. El resultado se expresa en por ciento y se calcula por la fórmula siguiente:

**Ecuación 1.** Determinación de materias extrañas.

$$P = \frac{X \cdot 100}{M}$$

**Fuente:** Migdalia, 2002.

Donde:

**P** = Porcentaje de materia extraña según su clasificación.

**X** = Peso de la materia extraña.

**M** = Peso inicial de la droga.

### **3.2.2 Determinación de microorganismos**

#### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

2 vasos de precipitación de 250mL, 3 placas petrifilm para aerobios totales, 10 mg de droga molida, 2 pipetas, succionador para pipeta, 1 pinza, 1 hisopo, 100 mL de TSA, 100 mL de TSB, agua destilada, autoclave, cámara de flujo laminar (marca: ESCO, modelo: ACB-4A2), alcohol al 70%, estufa, mechero, cofia, mascarilla, 1 par de guantes y papel aluminio.

#### **Procedimiento**

- Colocamos la droga en un vaso de precipitación con 100 mL de TSB (Trypticase Soy Broth, caldo tripticasa soya) y lo dejamos reposar 24 horas.
- Colocamos una gota del TSB con la droga en cada una de las placas petrifilm e incubamos por 24 horas a 37 °C.

- Realizamos el conteo de ufc (unidades formadoras de colonias) (Evans, 2011, pág. 16).

### **3.2.3 Determinación de Cenizas**

#### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

Crisol de porcelana o platino, ácido clorhídrico al 10 %, trípode, agua destilada, triángulo de porcelana, papel de filtro libre de cenizas, mechero, ácido nítrico reactivo, mufla (marca: Thermo scientific, modelo: F48010), solución de nitrato de amonio 10 g/100 mL, desecadora y peróxido de hidrógeno concentrado.

#### **Determinación de cenizas totales**

- Determinamos la masa de no menos de 2,0 g ni más de 3,0 g de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0,5 g en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado.
- Calentamos suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar.
- Incineramos en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C durante 2 horas.
- Enfriamos el crisol en una desecadora.
- Pesamos repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante).
- Obtenemos la masa constante en intervalos de 30 min. Entre calentamiento y pesada.
- Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrada, ácido nítrico o solución de nitrato

de amonio al 10 % m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.

Expresión de los resultados:

**Ecuación 2.** Determinación de cenizas totales.

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100\%$$

**Fuente:** Migdalia, 2002.

Donde:

**C** = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

**M** = masa del crisol vacío (g)

**M1** = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

**M2** = masa del crisol con la ceniza (g)

**100** = factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

### **Determinación de cenizas solubles en agua**

- Añadimos de 15 a 20 mL de agua a las cenizas totales obtenidas.
- Tapamos el crisol con un vidrio reloj y hervimos suavemente en la plancha térmica durante 5 minutos.
- Filtramos la solución a través del papel de filtro libre de cenizas.
- Transferimos el filtro con el residuo al crisol inicial, carbonizamos en mechero y luego incineramos en un horno mufla a 700 a 750 °C durante 2 horas.

- Colocamos en una desecadora y pesamos cuando alcance la temperatura ambiente.
- Repetimos el procedimiento hasta alcanzar el peso constante (Palomino, 2001, pág. 9).

Expresión de resultados:

**Ecuación 3.** Determinación de cenizas solubles en agua.

$$CA = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} * 100\%$$

**Fuente:** Migdalia, 2002.

Donde:

**CA** = Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

**M2** = Masa de crisol con las cenizas totales (g).

**Ma** = Masa del crisol con las cenizas solubles en agua (g).

**M1** = Masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

**M** = Masa del crisol vacío.

**100** = Factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

#### **3.2.4 Determinación de agua (humedad residual).**

##### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

Balanza analítica (marca: Mettler Toledo, modelo: ML204/01), cápsula de porcelana, estufa u horno de calentamiento (marca: Memmert modelo: SM 200) y desecadora.

## Procedimiento

- Pesamos 2 g con desviación permisible de 0,5 mg.
- Transferimos a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante.
- Desecamos a 105 °C durante 3h.
- Colocamos la cápsula en la desecadora donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó.
- Colocamos nuevamente en la estufa durante 1h, volviéndolo a pesar, hasta obtener una masa constante.

Expresión de los resultados:

**Ecuación 4.** Determinación de agua (humedad residual)

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

**Fuente:** Migdalia, 2002.

Donde:

**Hg** = pérdida en peso por desecación (%).

**M2** = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

**M1** = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

**M** = masa de la cápsula vacía.

**100** = factor matemático.

### 3.2.5 Determinación de sustancias extraíbles.

#### Equipos, reactivos, materiales e insumos

Balanza analítica (marca: Mettler Toledo, modelo: ML204/01), disolvente indicado (alcohol al 70%), erlenmeyer de boca esmerilada c/tapa 250 mL, zaranda., embudo., pipetas de 20 mL., papel de filtro, cápsula de porcelana., baño María y estufa (marca: Memmert, modelo SM 200).

#### Procedimiento

- De la muestra de ensayo previamente pulverizada y tamizada, se pesó exactamente 5 g y se transfirió a un erlenmeyer de 250 mL
- Se añadió 100 mL del disolvente, se tapó y se agitó durante 6h, dejándose en reposo hasta el día siguiente; se agitó 30 min., se dejó reposar alrededor de media hora más y se filtró por papel.
- Se tomó una alícuota de 20 mL que se transfirió a una cápsula previamente tarada. Se evaporó sobre baño María, se desecó en estufa a 105 °C durante 3 h, se dejó enfriar y se pesó.

Expresión de los resultados:

#### Ecuación 5. Determinación de sustancias extraíbles

$$Ss = \frac{R \cdot 500 \cdot 100}{M(100 - H)}$$

**Fuente:** Migdalia, 2002.

Donde:

**Ss** = Sustancias solubles (%).

**H** = Humedad de la muestra (%)

**500 y 100** = factores matemáticos para los cálculos.

**R** = Residuo de la muestra (g)

**M** = Masa de la muestra (g).

### **3.3 Elaboración de extractos**

Se realizó 5 maceraciones (4 de *Ficus citrifolia* y 1 de té verde) de concentración 1:10 (acuoso y alcohólico al 20%, 50%, 80% y 50% respectivamente) que reposaron 14 días a temperatura ambiente. Se filtraron y concentraron hasta alcanzar una concentración de 1 g/mL (extracto fluido).

### **3.4 Estudio fitoquímico de polifenoles**

#### **3.4.1 Determinación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).**

##### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

Tungstato de sodio dihidratado, matraz de Erlenmeyer, ácido fosfomolibdico, zaranda, carbonato de sodio deshidratado, embudo, ácido gálico, papel filtro, pipeta de 5 mL, matraz aforado a 50 mL, equipo de reflujo, espectrofotómetro (marca: Shimadzu, modelo: UV mini 1240) y celdas de vidrio, frascos de 5 mL y micro pipeta de 100 µL (marca: SUMEDIX, modelo:GE758511).

##### **Procedimiento**

##### **Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu:**

Se disolvió 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosfomolibdico y 5 mL de ácido fosfórico al 85% en 75 mL de agua destilada, se reflujo la solución por 2 horas y después se completó a 100 mL con agua.

##### **Curva de calibración:**

1.- Realizamos 10 mL de soluciones ácido gálico (0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 1 mg y 2 mg por mL de etanol al 96%).

2.- Tomamos 6 frascos de 5 mL y colocar 0,05 mL de las soluciones en cada uno así:

**Tabla 1.** Curva de calibración para fenoles totales

#Frasco	Muestra	Agua destilada	Reactivo de Folin-Ciocalteu
Blanco	-	4 mL	0,25 mL
#1	0,05 ml	3,95 mL	0,25 mL

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

Esperamos 2 minutos y agregamos 0,75 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y dejamos reposar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 horas y luego llevamos al espectrofotómetro y medimos la absorbancia a 765 nm.

Una vez generada se realizó el mismo procedimiento de la tabla pero con nuestra muestra (sólo la muestra). Esta última se disolvió en etanol al 96% con una relación 1/10. El cálculo de los fenoles totales se realizó mediante la ecuación generada por regresión lineal de la curva de calibración.

### 3.4.2 Determinación de Flavonoides totales

#### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

Hiperósido, etanol al 95%, etanol al 96%, frascos ámbar de 5 mL, macro pipeta de 5 mL (marca: Brinkman), micro pipeta de 100 µL (marca: SUMEDIX, modelo: GE768511) y puntas, agua destilada, papel aluminio, frascos ámbar de 10 mL, espectrofotómetro (marca: Shimadzu, modelo: UV mini 1240) y celdas de vidrio.

#### **Procedimiento**

- Realizamos las diluciones de hiperósido con etanol al 96% a partir de la solución madre en frascos ámbar de 5 mL.

Solución madre: 5 mg/5 mL (1 mg/mL)

Blanco: 500 µL etanol

Frasco #1: 50 µL Hiperósido + 450 µL etanol

Frasco #2: 100 µL Hiperósido + 400 µL etanol

Frasco #3: 250 µL Hiperósido + 250 µL etanol

Frasco #4: 350 µL Hiperósido + 150 µL etanol

**Tabla 2.** Curva de calibración para flavonoides totales

#Frasco	Hiperósido (Muestra)	Agua destilada	Etanol 95%	Acetato de potasio	Cloruro de aluminio 10%
Blanco	-	2,8 mL	2 mL	0,1 mL	0,1 mL
#1	0,5 mL	2,8 mL	1,5 mL	0,1 mL	0,1 mL
#2	0,5 mL	2,8 mL	1,5 mL	0,1 mL	0,1 mL
#3	0,5 mL	2,8 mL	1,5 mL	0,1 mL	0,1 mL
#4	0,5 mL	2,8 mL	1,5 mL	0,1 mL	0,1 mL

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

- Después de 30 minutos realizamos las lecturas en espectrofotómetro a 415 nm.
- Una vez generada la curva, se realizó el mismo procedimiento de la tabla pero con nuestra muestra en lugar del hiperósido (sólo 1 muestra). Esta última se disolvió en etanol al 96% con una relación 1/10. Los flavonoides totales se calcularon mediante la ecuación generada por regresión lineal de la curva de calibración.

### 3.5 Actividad antioxidante

#### 3.5.1 Método DPPH

##### Equipos, reactivos, materiales e insumos

Radical DPPH, etanol 96%, 2 balones aforados de 10 mL, 1 balón aforado de 100 mL, 21 frascos ámbar de 5 mL, 2 frascos ámbar de 10 mL, 1 frasco ámbar de 250 mL, balanza analítica (marca: Mettler Toledo, modelo: ML204/01), zaranda, extracto fluido de la planta de interés, micropipetas de 1-3000 µL

(marca: DROPTEK, modelo: DX40253) con varias puntas, papel aluminio y espectrofotómetro (marca: Shimadzu, modelo: UV mini 1240) y celdas de vidrio.

## **Procedimiento**

### **Preparación del reactivo DPPH**

- Preparamos una solución 0,5 mM de DPPH en etanol al 96% (Pesamos 49 mg de DPPH y se aforó a 250 mL con alcohol en la oscuridad), colocamos en un frasco ámbar y mantenemos en refrigeración hasta el momento del ensayo.
- Tomamos 1 mL del extracto fluido del material vegetal de interés y aforamos a 10 mL con etanol al 96%. Hacemos lo mismo con el patrón de origen vegetal (Té verde) pero tomando 0,100 mL del extracto de té y aforar a 10 mL.
- Preparamos una solución 1000 ppm de ácido ascórbico.
- Encendimos el espectrofotómetro y programamos la longitud de onda a 517 nm.
- Enceramos el espectrofotómetro con etanol al 96%.
- Tomamos los frascos ámbar y preparamos las muestras de vitamina C, extractos de *Ficus citrifolia* y extracto de té verde como dice la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Lecturas del antirradical DPPH

Frascos	Muestra	DPPH	Etanol 96%
Blanco	-	2,9 mL	100 µL
# 1	1 µL	2,9 mL	99 µL
# 2	5 µL	2,9 mL	95 µL
# 3	10 µL	2,9 mL	90 µL
# 4	20 µL	2,9 mL	80 µL
# 5	50 µL	2,9 mL	50 µL
# 6	80 µL	2,9 mL	20 µL
# 7	100 µL	2,9 mL	0 µL

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

- Colocamos los frascos dentro de un vaso de precipitación y lo dejamos agitar a 200 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Medimos la absorbancia de los frascos comenzando por el blanco y luego los otros de forma ascendente.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula:

**Ecuación 6.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \left( \frac{A_A}{A_B} \right) \times 100$$

**Fuente:** Scartezzini, 2006

Donde:

**A<sub>A</sub>** representa la absorbancia de DPPH con el extracto y el **A<sub>B</sub>** representa la absorbancia de DPPH sin el extracto.

Construimos un gráfico de % de inhibición vs la concentración. La Actividad antioxidante se expresa como una concentración, IC<sub>50</sub>, en µg/mL, que se requiere para el 50% de inhibición de la formación del radical DPPH.

### 3.5.2 Método ABTS.

#### Equipos, reactivos, materiales e insumos

Radical ABTS, agua bidestilada,  $K_2S_2O_8$ , etanol 96%, cubeta, espátula, espectrofotómetro (marca: Shimadzu, modelo UV mini 1240), micropipeta de 10-1000  $\mu$ L (marca: DROPTEK, modelo: DX40253)

#### Procedimiento

##### Preparación de la solución madre de ABTS

- Se preparó una solución madre de ABTS de 2mM disolviendo exactamente 27,5 mg de ABTS (2,2' Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico) en 25 mL de agua bidestilada, la solución debe ser azulada; si es demasiado azul quiere decir que ya está oxidada y es mejor no usarla (la solución se mantiene por 48 horas).

##### Preparación de la solución de $K_2S_2O_8$

- Se preparó una solución de 70mM de  $K_2S_2O_8$  obtenida de disolver 188,2 mg de  $K_2S_2O_8$  en 10 mL de agua bidestilada.

##### Preparación del ABTS radicalizado

- A la solución de ABTS radicalar añadimos 250 $\mu$ L de solución de  $K_2S_2O_8$  se agitó y se conservó en la oscuridad al menos por 6 horas para permitir la radicalización (mejor toda la noche). La solución dura 2 días y permanece azulada.

##### Preparación de las soluciones

- Diluimos 1 mL de extracto (Té verde y *F. citrifolia*) en 250 mL de etanol al 96% (solución madre).
- Solución 1: 50  $\mu$ L de solución madre+ 250  $\mu$ L de etanol al 96%

- Solución 2: 20  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 280  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 3: 10  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 290  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 4: 5  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 295  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 5: 2  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 298  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 6: 1  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 299  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Blanco: 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Control positivo vitamina C
- Diluimos 1 g de vitamina C en 1000 mL de etanol al 96% (solución madre)
- Solución 1: 50  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 2: 20  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 280  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 3: 10  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 290  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 4: 5  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 295  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 5: 2  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 298  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Solución 6: 1  $\mu\text{L}$  de solución madre+ 299  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%
- Blanco: 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%

#### **Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas**

- Tomamos 2 mL del ABTS radicalizado y añadimos aproximadamente 25 mL de etanol hasta que se obtuvo una absorbancia  $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$ . Este paso se hizo en compañía del profesor.

### **Lectura del blanco**

- Tomamos 2,7 mL de solución de ABTS para lecturas espectrofotométricas y añadimos 0,3 mL de etanol, en la cubeta se agitó por un minuto y se procedió a leer la absorbancia.

### **Lectura de las soluciones**

- Tomamos 2,7 mL de solución de ABTS para lecturas espectrofotométricas y añadimos 0,3 mL de cada solución de extracto.

El porcentaje de capacidad antioxidante se calculó con la siguiente fórmula:

**Ecuación 7.** Porcentaje de la capacidad antioxidante ABTS

$$\% \text{ ABTS} = \left[ 1 - \frac{(A2 - A3)}{A1} \right] \times 100$$

**Fuente:** Miller, 1993.

Donde:

**A1.** Absorbancia del patrón de referencia (ABTS-Etanol).

**A2.** Absorbancia de la muestra a los 7 minutos.

**A3.** Absorbancia del blanco de muestra.

## **3.6 Cromatografía**

### **3.6.1 Cromatografía de capa fina (TLC)**

#### **Equipos, reactivos, materiales e insumos**

Placas cromatográficas de silicagel 10 x10 cm, ácido acético, ácido fórmico, acetato de etilo, agua destilada, etanol al 96%, cloruro de aluminio, cubeta para cromatografía, cámara de luz UV 254 - 366 nm, nebulizador, bomba de aire, DPPH, pipetas, succionador para pipetas, balanza analítica (marca:

Mettler Toledo, modelo: ML204/01), ultrasonido (marca: Branson, modelo: 1510R-MTH), capilar de 20  $\mu$ L, cromatógrafo (marca: CAMAG, modelo: Linomat 5), frasco ámbar de 5 mL, extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia*, Sorbona, papel aluminio.

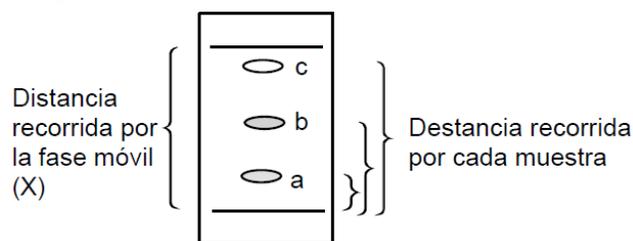
### **Procedimiento**

- Colocamos 20  $\mu$ L del extracto de *Ficus citrifolia* en el frasco ámbar de 5 mL y 980  $\mu$ L de metanol. Dejamos en el ultrasonido por 5 min.
- Realizamos una mezcla de acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua en proporciones 100:11.11.27 (Fase móvil).
- Preparamos 20 mL de solución de DPPH al 0,5% en etanol al 96%.
- Preparamos 50 mL de solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol al 96%.
- Tomamos 20  $\mu$ L de la solución metanólica con el capilar y colocamos en el cromatógrafo para imprimir las muestras. Necesitamos al menos 2.
- Colocamos la fase móvil en la cubeta para cromatografía y colocamos la placa de silicagel.
- Dejamos reposar en la sorbona hasta que el solvente casi alcance el final de la placa cromatográfica.
- Sacamos la placa y dejamos secar.
- Tapamos un lado de la placa cromatográfica con papel aluminio y rociamos la otra con la solución de cloruro de aluminio usando el nebulizador. Dejamos secar y cubrimos con papel aluminio mientras se descubrió el lado que estaba cubierto al principio.

- Rociamos el otro lado con la solución de DPPH y tomamos fotografías de la placa inmediatamente identificando las fracciones que se tornen más transparentes.
- Dejamos secar la placa y llevamos a la cámara de luz UV para observar la separación de la muestra en manchas que se pudieron apreciar del lado donde se roció cloruro de aluminio.

Calculamos los Rfs correspondientes a las manchas como se muestra en la **Figura 3** mediante la **Ecuación 8**.

**Figura 3.** Factor de retardo de una muestra



**Fuente:** Abbott, 1970

**Ecuación 8.** Factor de retardo de una muestra

$$Rf = \left[ \frac{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}{\text{Distancia recorrida por la muestra}} \right]$$

**Fuente:** Abbott, 1970.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis de las drogas

Los ensayos fueron realizados por triplicado y para expresar los resultados se usaron los promedios. A continuación se resumen los resultados en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Resumen de ensayos de análisis de la droga.

<b>Análisis de la droga</b>		
<b>Ensayos</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Materias extrañas</b>	3,85%	0
<b>Microorganismos (ufc)</b>	0	0
<b>Cenizas totales</b>	8,76%	0,042
<b>Cenizas solubles en agua</b>	1,31%	0,269
<b>Humedad</b>	9,46%	0,072
<b>Sustancias extraíbles</b>	33,30%	1,179

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

##### 4.1.1 Ensayo de materias extrañas

El único material encontrado correspondía a pequeños trozos de cartón usado durante el secado y almacenamiento. No se encontraron restos de insectos ni de otros vegetales.

##### 4.1.2 Determinación de microorganismos

Al cabo de 24 horas no se evidenció el crecimiento de ninguna ufc en las tres cajas petrifilm. Esto obedece al lavado y desinfección previo al secado y la molienda de la droga.

##### 4.1.3 Determinación de cenizas

**Cenizas totales:** 8,76%

**Cenizas solubles en agua:** 1,31%

El valor de cenizas totales supera levemente el rango de aceptabilidad del 5%, probablemente por presencia de metales pesados.

#### **4.1.4 Determinación del agua (humedad residual)**

El valor obtenido es de 9,45%, lo cual se encuentra en el rango de aceptabilidad que va desde el 9 - 14%.

#### **4.1.5 Determinación de sustancias extraíbles**

Se determinó que el porcentaje de sustancias extraíbles en etanol al 70% corresponde al 33,3%, de manera que una tercera parte del peso seco de la droga corresponde a sustancias solubles en alcohol.

### **4.2 Estudio fitoquímico de los polifenoles**

#### **4.2.1 Determinación de Fenoles Totales (FC)**

Debido a que el té verde posee una alta concentración en polifenoles (25-35%) (Jun, 2010, pág. 230), se lo usó como estándar natural.

En la **Tabla 5** se observa que la cantidad de fenoles es mayor en los extractos alcohólicos que en el acuoso, además, como era de esperarse, el contenido de fenoles en el té verde es mayor que los extractos de *F. citrifolia*. Sin embargo los valores obtenidos son importantes, puesto que el más bajo (extracto acuoso de *F. citrofolia*), es cuatro veces menor al extracto de té verde y, el mayor (extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia*) es solo 1,33 veces menor al del té. Se debe tener en cuenta que el extracto de té verde es alcohólico al 50%.

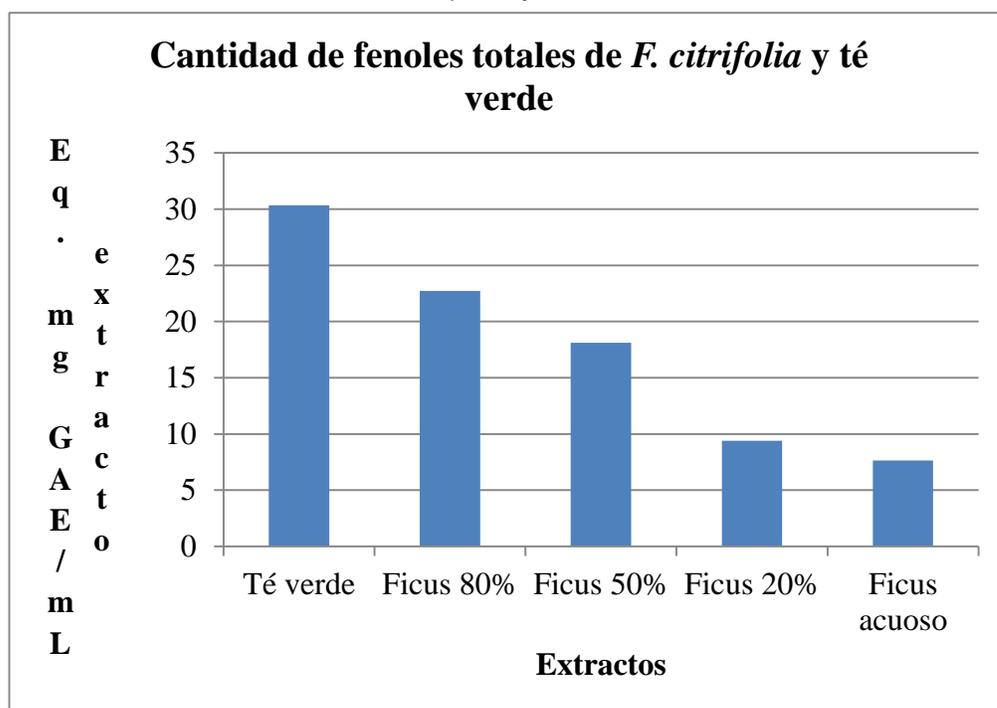
**Tabla 5.** Fenoles totales en extractos de *Ficus citrifolia* y té verde.

Fenoles totales					
Extracto	Absorbancia a 765 nm			Promedio	Eq. mg GAE/mL extracto
Té verde	2,662	2,662	2,643	2,656	30,354
<i>F. citrifolia</i> 80%	1,975	1,98	1,985	1,980	22,728
<i>F. citrifolia</i> 50%	1,573	1,569	1,571	1,571	18,112
<i>F. citrifolia</i> 20%	0,797	0,798	0,798	0,798	9,383
<i>F. citrifolia</i> acuoso	0,642	0,643	0,643	0,643	7,634

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 1** se puede visualizar la cantidad de fenoles totales en los extractos de *F. citrifolia* y té verde y la diferencia que existe entre ellos.

**Gráfico 1.** Comparación de la cantidad de fenoles totales entre los extractos de *F. citrifolia* y té verde.



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

#### 4.2.2 Determinación de Flavonoides Totales

Los valores de los flavonoides totales obtenidos (**Tabla 6**) son menores a los de fenoles totales (**Tabla 5**), puesto que son solo una parte de los compuestos fenólicos presentes en la planta y, por tanto, guarda proporcionalidad con ellos. Una vez más, se evidencian mayores valores en los extractos alcohólicos. Por ejemplo, al compararlos con el té verde, el contenido de flavonoides totales del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* es 1,19 veces mayor y el extracto alcohólico al 50% de *F. citrifolia* es 1,33 veces menor. Los valores más bajos fueron los de los extractos acuoso y alcohólico al 20% de *F. citrifolia* q fueron 1,76 y 2,27 veces menores al extracto de té verde respectivamente.

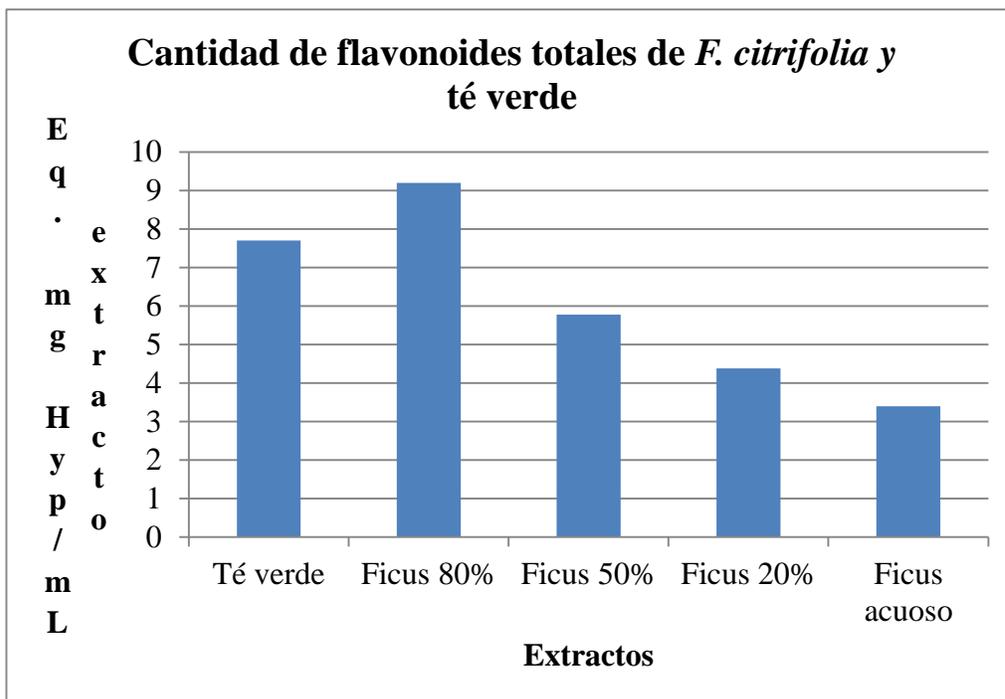
**Tabla 6.** Flavonoides totales de extractos de *Ficus citrifolia* y té verde.

Flavonoides totales					
Extracto	Absorbancia a 415 nm			Promedio	Eq. mg Hyp/mL extracto
Té verde	2,292	2,29	2,28	2,287	7,706
<i>F. citrifolia</i> 80%	2,777	2,701	2,743	2,740	9,198
<i>F. citrifolia</i> 50%	1,701	1,704	1,698	1,701	5,774
<i>F. citrifolia</i> 20%	1,28	1,279	1,277	1,279	4,382
<i>F. citrifolia</i> acuoso	0,959	0,989	0,987	0,978	3,393

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 2** se presenta una comparación de la cantidad de flavonoides totales encontrados en los extractos de *F. citrifolia* y té verde, pudiendo observarse las diferencias entre ellos.

**Gráfico 2.** Comparación de la cantidad de flavonoides totales entre los extractos de *F. citrifolia* y té verde.



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

### 4.3 Determinación de Actividad Antioxidante

#### 4.3.1 Método DPPH

Todos los extractos estudiados demostraron actividad antioxidante, sin embargo se evidenció mayor actividad para atrapar al radical DPPH en los extractos alcohólicos y que fue disminuyendo al aumentar la polaridad.

En este ensayo se tomó en cuenta el valor del  $IC_{50}$  que corresponde a la concentración necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH; a valores más bajos del  $IC_{50}$  mayor es la actividad antioxidante. En esta prueba se tiene una concentración constante de DPPH que permite que, aunque se incremente la concentración de la muestra, habrá un límite de decoloración y, consecuentemente de absorbancia.

Numerosos estudios in vitro han demostrado que los polifenoles del té son neutralizadores efectivos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, incluyendo los radicales superóxido (Nakagawa, 2002, pág. 1747) y por eso se usó el té verde como estándar natural, además de la vitamina C. Los datos de su actividad antioxidante pueden corroborarse con los valores de IC<sub>50</sub> representados en las **Tablas 7 y 8** respectivamente.

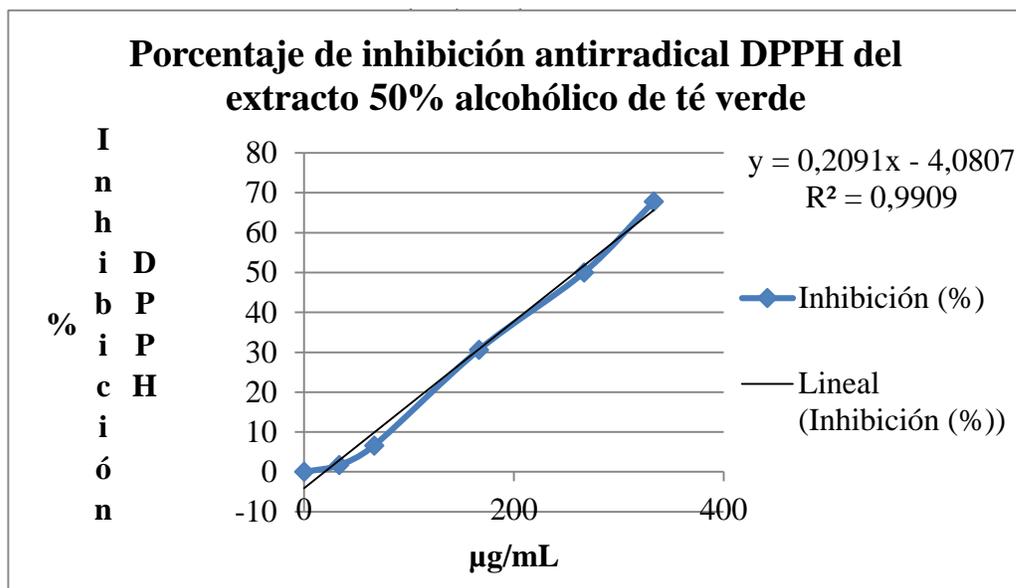
**Tabla 7.** Actividad antirradical DPPH del extracto 50% alcohólico de té verde.

<b>Extracto 50% alcohólico de té verde</b>						
<b>µL de Ext.</b>	<b>µg/mL</b>	<b>Absorbancia a 517 nm</b>			<b>Promedio</b>	<b>Inh. (%)</b>
0	0	3,23	3,208	3,219	3,219	0
10	33,333	3,177	3,177	3,14	3,165	1,688
20	66,667	3,015	2,988	3,015	3,006	6,617
50	166,667	2,232	2,236	2,232	2,233	30,620
80	266,667	1,609	1,612	1,609	1,610	49,984
100	333,333	1,037	1,038	1,035	1,037	67,795
<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>						<b>258,253</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El **Gráfico 3** demuestra que la captación de radicales comienza desde concentraciones muy pequeñas (33,3 µg/mL) y, que continúa aumentando conforme se incrementa la concentración.

**Gráfico 3.** Porcentaje de inhibición de DPPH del extracto 50% alcohólico



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

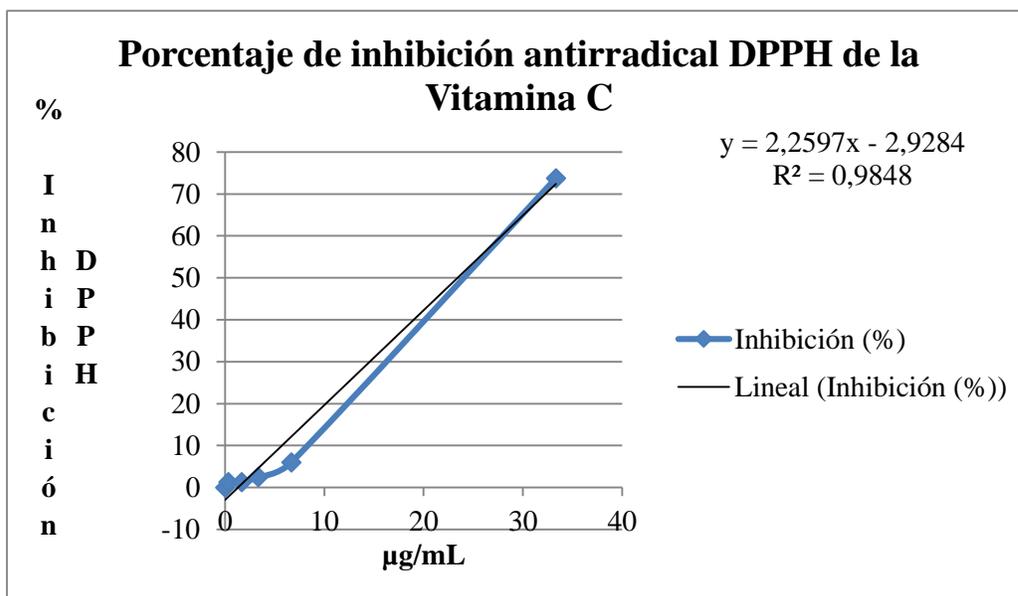
El valor del IC<sub>50</sub> obtenido para la vitamina C (**Tabla 8**) es 14,47 veces menor al valor obtenido para el extracto alcohólico al 50% de té verde (**Tabla 7**), demostrando una vez más su ya conocida actividad antioxidante (**Gráfico 3**).

**Tabla 8.** Actividad antirradical DPPH de la vitamina C.

Vitamina C						
µL de Ext.	µg/mL	Absorbancia a 517 nm			Promedio	Inh. (%)
0	0	3,219	3,219	3,218	3,219	0
1	0,333	3,177	3,177	3,177	3,177	1,305
5	1,667	3,177	3,177	3,176	3,177	1,315
10	3,333	3,139	3,136	3,141	3,139	2,496
20	6,667	3,08	2,999	3,001	3,027	5,975
100	33,333	0,843	0,845	0,844	0,844	73,781
<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>						<b>17,846</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Gráfico 4.** Porcentaje de inhibición de antirradical DPPH de vitamina C



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El valor del IC<sub>50</sub> del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia*, presentado en la **Tabla 9**, es mayor que la de los estándares (1,47 veces mayor al té verde y 21,31 veces mayor a la vitamina C) y, consecuentemente demuestra una actividad antioxidante menor.

**Tabla 9.** Actividad antirradical DPPH del extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia*.

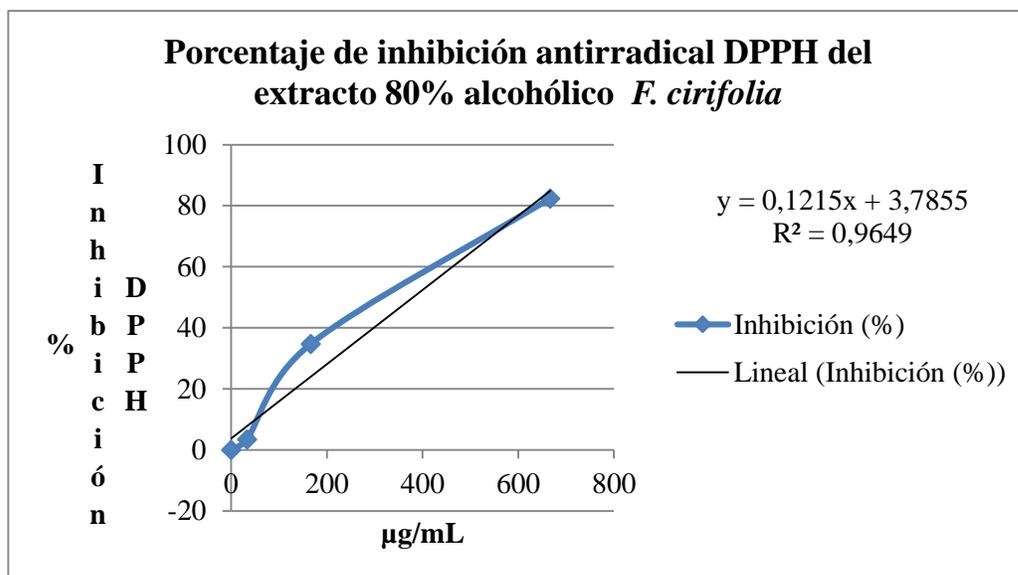
Extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i>						
µL de Ext.	µg/mL	Absorbancia a 517 nm			Promedio	Inh. (%)
0	0	3,225	3,183	3,205	3,204	0
1	33,333	3,111	3,078	3,095	3,095	3,412
5	166,667	2,091	2,094	2,093	2,093	34,686
20	666,667	0,566	0,565	0,566	0,566	82,345
<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>						<b>380,366</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El comportamiento de la inhibición antirradical en el extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* alcanzó un nivel de estabilidad al llegar a concentraciones más altas y se frenó la inhibición del radical de DPPH, por lo que solo se tomó en

cuenta las concentraciones más bajas para la elaboración de la **Tabla 9** y el **Gráfico 5**. Esto no afecta al cálculo del  $IC_{50}$  debido a que dicho valor se encuentra dentro de estas concentraciones y se las calcula por la ecuación obtenida de una regresión lineal.

**Gráfico 5.** Porcentaje de inhibición antirradical DPPH del extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia*



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En cuanto al extracto alcohólico al 50% de *F. citrifolia* se refiere (**Tabla 10**), se tiene un valor de  $IC_{50}$  muy parecido al alcohólico al 80%, puesto que es solo 1,14 veces mayor a éste. También es 1,68 veces mayor al del té verde y 24,32 veces mayor al de la vitamina C.

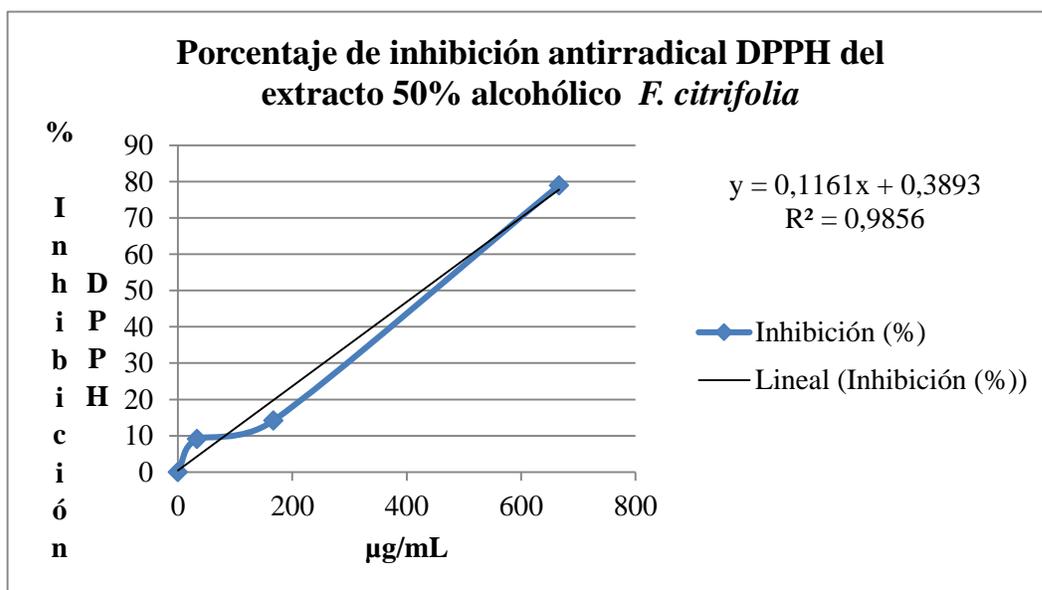
**Tabla 10.** Actividad antirradical (DPPH) del extracto 50% alcohólico de *F. citrifolia*.

Extracto 50% alcohólico de <i>F. citrifolia</i>						
µL de Ext.	µg/mL	Absorbancia a 517 nm			Promedio	Inh. (%)
0	0	3,783	3,228	3,506	3,506	0
1	33,333	3,188	3,186	3,187	3,187	9,099
5	166,667	3,024	2,997	3,010	3,010	14,138
20	666,667	0,737	0,74	0,734	0,737	78,979
<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>						<b>434,016</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El **Gráfico 6** muestra el comportamiento de la actividad antirradical del extracto alcohólico al 50% de *F. citrifolia* con su correspondiente ecuación de la recta.

**Gráfico 6.** Porcentaje de inhibición antirradical DPPH en extracto 50% alcohólico de *F. citrifolia*



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

Para el extracto alcohólico al 20% de *Ficus citrifolia* se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> (**Tabla 11**) 1,88 veces mayor al del té verde, 27,15 veces mayor al de la

vitamina C, 1,27 veces mayor a la del extracto alcohólico al 80% y 1,12 veces mayor a la del extracto alcohólico al 50% de la misma planta.

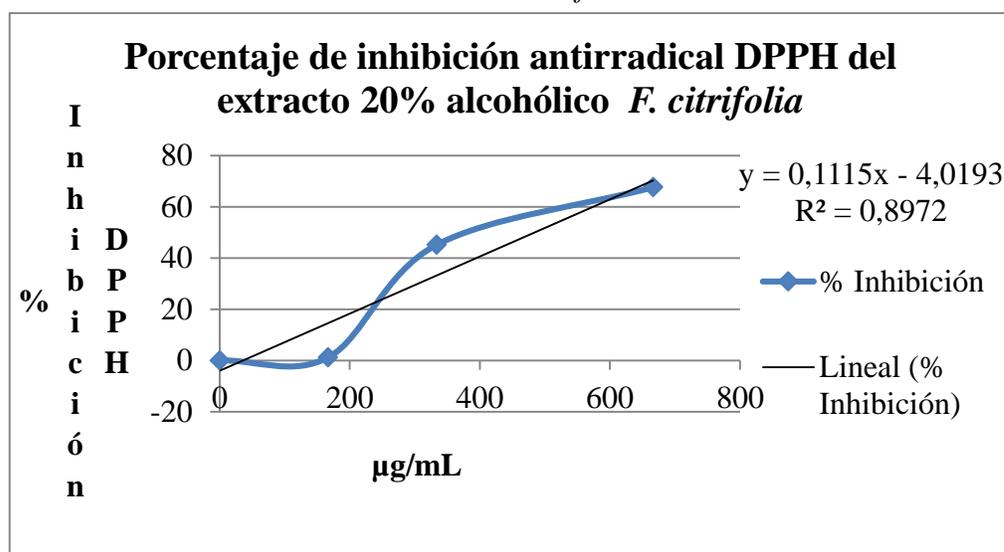
**Tabla 11.** Actividad antirradical (DPPH) del extracto 20% alcohólico de *F. citrifolia*

Extracto 20% alcohólico de <i>F. citrifolia</i>						
µL de Ext.	µg/mL	Absorbancia a 517 nm			Promedio	Inh. (%)
0	0	3,18	3,173	3,167	3,173	0
5	166,667	3,135	3,139	3,131	3,135	1,198
10	333,333	1,752	1,739	1,73	1,740	45,152
20	666,667	1,031	1,029	1,02	1,027	67,644
<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>						<b>484,478</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El **Gráfico 7** representa el comportamiento antirradical del extracto alcohólico al 20% de *Ficus citrifolia*. Al igual que los anteriores extractos, éste también se estabiliza al llegar a mayores concentraciones por lo que sólo se presentan las concentraciones más bajas usadas antes de llegar a dicha estabilidad.

**Gráfico 7.** Porcentaje de inhibición antirradical DPPH en extracto 20% alcohólico de *F. citrifolia*



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El último de los extractos de *Ficus citrifolia* evaluados fue el acuoso, y sus valores se presentan en la **Tabla 12**. El valor del IC<sub>50</sub> obtenido para este extracto es el mayor de todos, puesto que es 5,03 veces mayor al del té verde, 72,8 veces mayor al de la vitamina C, 3,42 veces mayor a la del extracto al 80%, 2,99 veces mayor al del extracto al 50% y 2,68 veces mayor al del extracto alcohólico al 20% de la misma planta.

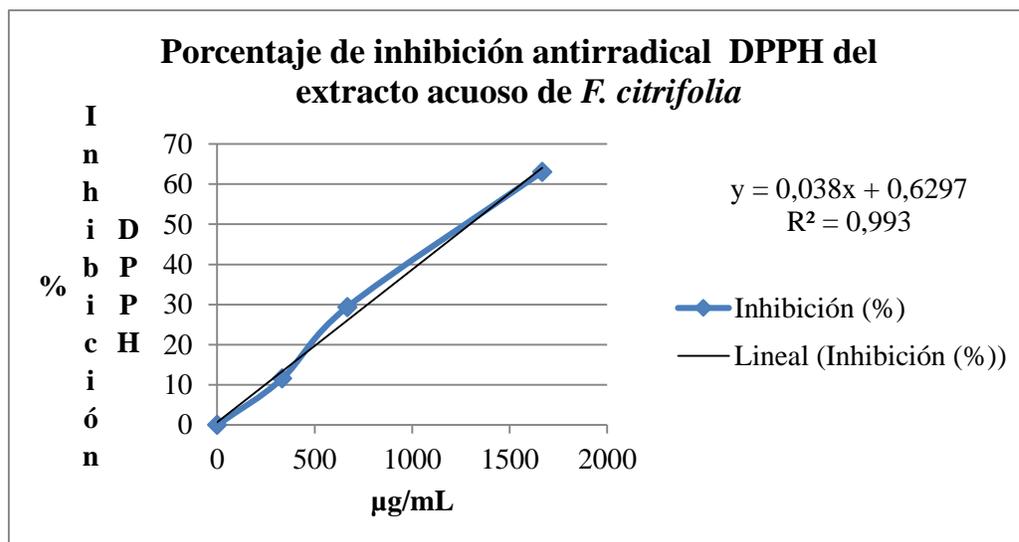
**Tabla 12.** Actividad antirradical (DPPH) del extracto acuoso de *F. citrifolia*.

<b>Extracto acuoso de <i>F. citrifolia</i></b>						
<b>µL de Ext.</b>	<b>µg/mL</b>	<b>Absorbancia a 517 nm</b>			<b>Promedio</b>	<b>Inh. (%)</b>
0	0	3,265	3,265	3,265	3,265	0
10	333,333	2,897	2,876	2,889	2,887	11,567
20	666,667	2,316	2,307	2,295	2,306	29,372
50	1666,667	1,208	1,207	1,205	1,207	63,042
					<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>	<b>1299,218</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 8** se muestra el comportamiento antirradical del extracto acuoso de *F. citrifolia*. Al igual que todos los extractos de *F. citrifolia*, éste alcanzó una estabilización a concentraciones mayores, por lo que sólo se tomaron las concentraciones más bajas.

**Gráfico 8.** Porcentaje de inhibición antirradical DPPH del extracto acuoso de *F. citrifolia*

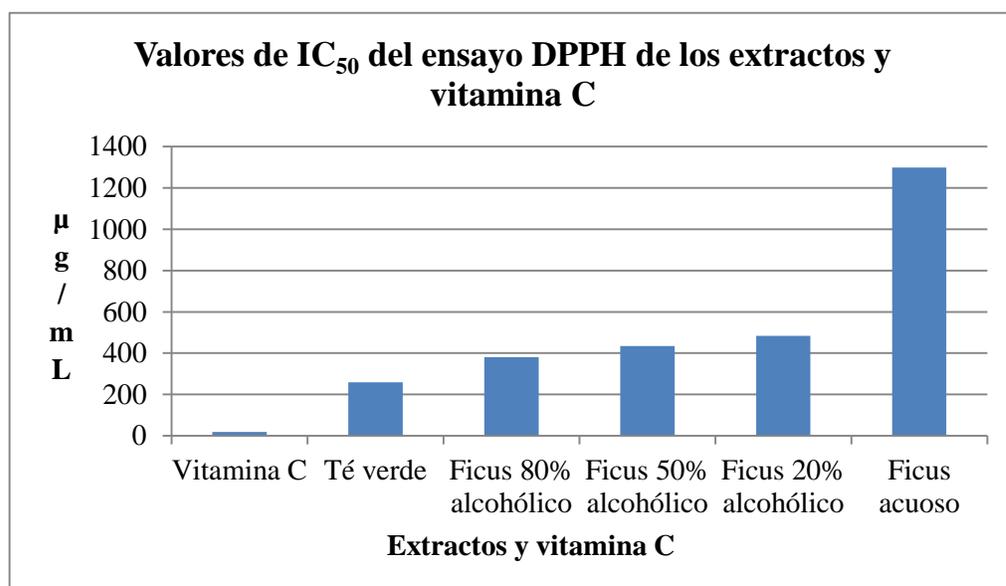


Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En las tablas anteriores se demuestra una correlación entre la cantidad de fenoles y flavonoides totales y la actividad antioxidante de cada extracto, por ejemplo los valores del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* demostró el valor más bajo de IC<sub>50</sub> y el más alto de fenoles y flavonoides totales. El valor de IC<sub>50</sub> más alto es el del extracto acuoso, como era de esperarse, debido a la naturaleza química de los polifenoles que se disuelven mejor en alcohol.

En el **Gráfico 9** se evidencia las diferencias entre los valores de IC<sub>50</sub> de la vitamina C y los extractos de *F. citrifolia* y té verde. Nótese la importancia de haber tomado al té verde como estándar de origen natural, ya que la actividad antioxidante de *F. citrifolia* y el té verde resultaron ser similares, además lo que se está evaluando es una planta y no sólo un compuesto.

**Gráfico 9.** Valores de IC<sub>50</sub> de la vitamina C y de los extractos de *F. citrifolia* y Té verde.



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

Cabe señalar que la actividad antioxidante no está simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos. Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: La existencia de agliconas libres y su incorporación a la determinación, además el hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. El sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido cítrico ya ha sido reportado (Rizner Hras, 2000, pág. 229).

#### 4.3.2 Método ABTS

Todos los extractos estudiados demostraron actividad antioxidante, sin embargo se evidencia mayor actividad para atrapar al catión radical ABTS (este catión radical es de color azul), en los extractos alcohólicos y que va disminuyendo al aumentar la polaridad.

En este ensayo también se toma en cuenta el valor del IC<sub>50</sub>. En esta prueba se tiene una concentración constante de ABTS que permite que, aunque se

incremente la concentración de la muestra, habrá un límite de decoloración y, consecuentemente de absorbancia. Durante la reacción, el catión radical ABTS azul vuelve a su forma neutra incoloro.

Se usó el té verde como estándar natural y a la vitamina C debido a que ambos poseen actividad antioxidante importante que puede corroborarse con los valores de IC<sub>50</sub> representados en las **Tablas 13 y 14** respectivamente.

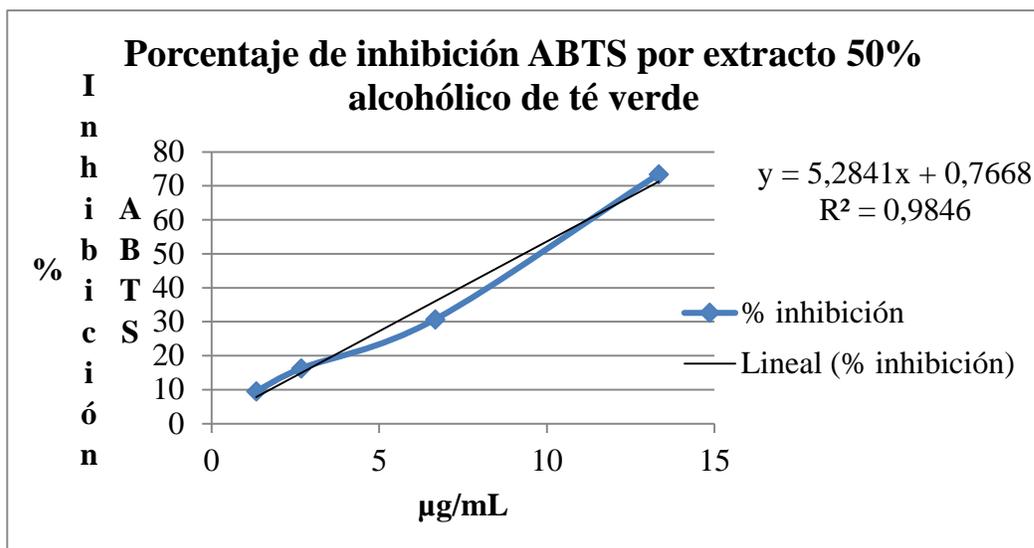
**Tabla 13.** Actividad antirradical ABTS del extracto 50% alcohólico de té verde

Extracto 50% alcohólico de té verde								
μL de Ext.	μg/mL	Absorbancia 734 nm					Promedio	Inh. (%)
10	13,333	0,03	0,025	0,023	0,023	0,024	0,025	73,429
5	6,667	0,349	0,331	0,32	0,313	0,308	0,324	30,686
2	2,667	0,441	0,43	0,424	0,419	0,413	0,425	16,229
1	1,333	0,487	0,477	0,47	0,465	0,462	0,472	9,543
0	0	0,543	0,524	0,536	0,531	0,527	0,532	0
							<b>IC<sub>50</sub> μg/mL</b>	<b>9,317</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El **Gráfico 10** demuestra que la captación de radicales ABTS comienza desde concentraciones muy pequeñas (1,333 μg/mL) y continúa la inhibición de manera gradual hasta alcanzar una inhibición del 73% apenas con 13,333 μg/mL.

**Gráfico 10.** Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 50% alcohólico de té verde



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En la **Tabla 14** el valor del  $IC_{50}$  obtenido para la vitamina C es 2,14 veces menor al valor obtenido para el extracto 50% alcohólico de té verde (**Tabla 13**), demostrando mayor actividad antioxidante. Para este ensayo, la actividad antioxidante de la vitamina C y los extractos de té verde y de *F. citrifolia*, sigue sin estabilizarse a concentraciones mayores por lo que sólo se han tomado las concentraciones más bajas que conservan linealidad para elaborar las tablas y los gráficos, pero que no afectan al cálculo del  $IC_{50}$  porque éste se encuentra dentro de dichos valores.

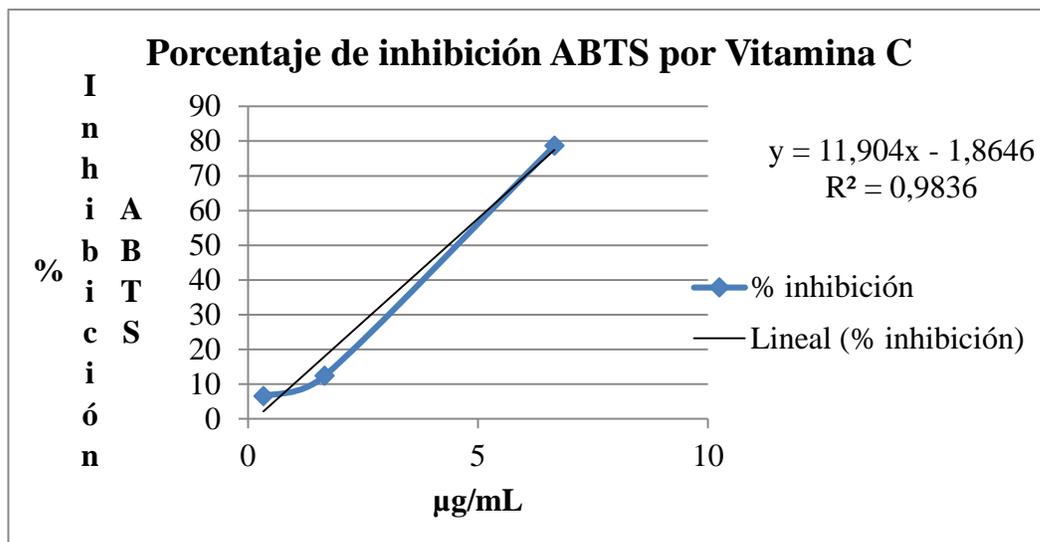
**Tabla 14.** Actividad antirradical ABTS de la vitamina C

Vitamina C								
µL de Ext.	µg/mL	Absorbancia 734 nm					Promedio	Inh. (%)
20	6,667	0,003	0,001	0	0	0	0,001	78,678
5	1,667	0,464	0,463	0,458	0,455	0,449	0,458	12,350
1	0,333	0,502	0,499	0,497	0,496	0,495	0,498	6,544
0	0,000	0,544	0,539	0,535	0,533	0,531	0,536	0
<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>								<b>4,357</b>

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 11** se demuestra como con concentraciones tan bajas de vitamina C (6,667  $\mu\text{g/mL}$ ) de vitamina C se ha inhibido casi el 80% del radical ABTS.

**Gráfico 11.** Porcentaje de inhibición ABTS por Vitamina C



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En la **Tabla 15** se evidencia que la actividad antioxidante del extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia* es muy buena puesto que, el valor del  $\text{IC}_{50}$  del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* es muy similar a la del té verde (apenas 1,04 veces mayor) y 2,22 veces mayor a la vitamina C. Los valores demuestran menor diferencia que el ensayo de DPPH, pero son válidos para demostrar la similitud de la actividad antioxidante de *F. citrifolia* y el té verde.

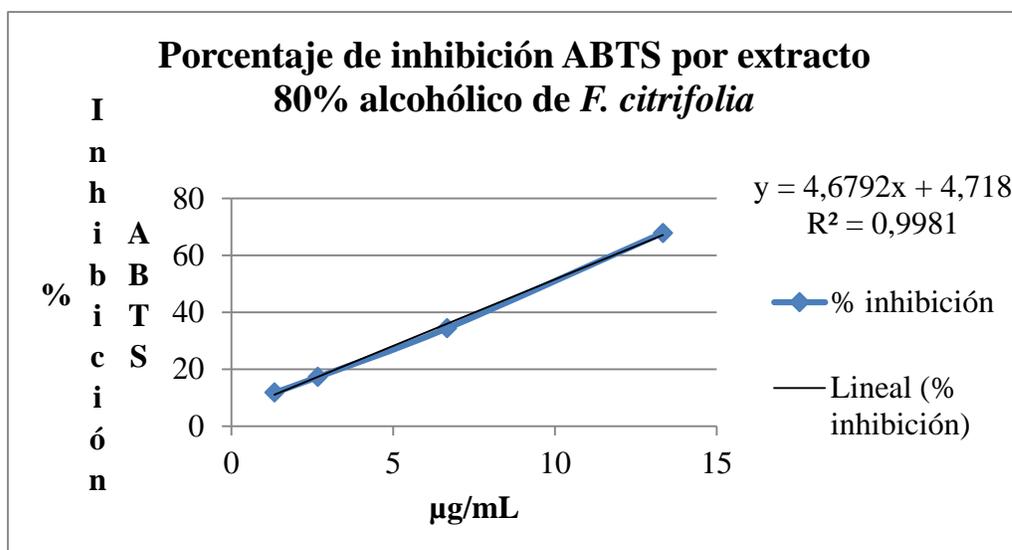
**Tabla 15.** Actividad antirradical (ABTS) del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia*

Extracto 80% alcohólico de <i>F. citrifolia</i>								
$\mu\text{L}$ de Ext.	$\mu\text{g/mL}$	Absorbancia 734 nm					Promedio	Inh. (%)
10	13,333	0,106	0,089	0,049	0,048	0,025	0,063	67,801
5	6,667	0,333	0,308	0,293	0,279	0,27	0,297	34,343
2	2,667	0,436	0,419	0,413	0,406	0,405	0,416	17,241
1	1,333	0,471	0,476	0,447	0,439	0,436	0,454	11,789
0	0,000	0,535	0,53	0,529	0,526	0,524	0,529	0
							<b>IC<sub>50</sub> <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>9,677</b>

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 12** se muestra el comportamiento de la inhibición antirradical en el extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia* y la similitud con el extracto 50% alcohólico del té verde.

**Gráfico 12.** Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia*



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En la **Tabla 16** se observa que el valor de IC<sub>50</sub> del extracto alcohólico al 50% de *F. citrifolia*, es 1,64 veces mayor al del té verde, 3,5 veces mayor al de la vitamina C y 1,58 veces mayor al del extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia*.

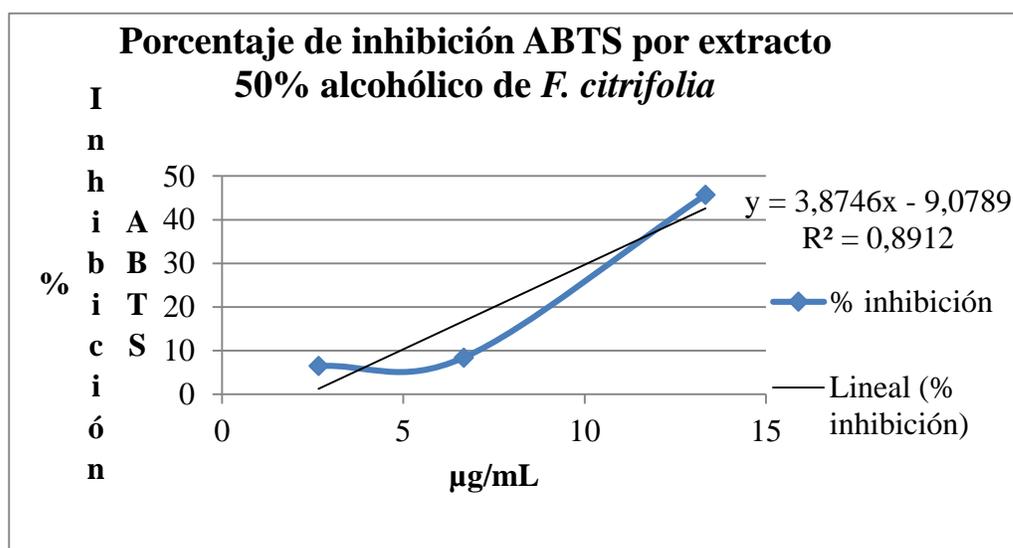
**Tabla 16.** Actividad antirradical ABTS del extracto alcohólico al 50% de *F. citrifolia*

Extracto 50% alcohólico de <i>F. citrifolia</i>								
$\mu\text{L}$ de Ext.	$\mu\text{g/mL}$	Absorbancia 734 nm					Promedio	Inh. (%)
10	13,333	0,245	0,208	0,188	0,172	0,159	0,194	45,709
5	6,667	0,461	0,497	0,438	0,432	0,427	0,451	8,413
2	2,667	0,479	0,466	0,462	0,46	0,455	0,464	6,465
0	0,000	0,5	0,506	0,503	0,502	0,501	0,502	0
							<b>IC<sub>50</sub> <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>15,248</b>

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

El **Gráfico 13** muestra el comportamiento de la actividad antirradical del extracto alcohólico al 50% de *F. citrifolia*. Se puede notar que aumentando la polaridad del solvente ya se evidencia como ha disminuido la actividad antioxidante en relación al extracto 80% alcohólico de la misma planta.

**Gráfico 13.** Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 50% alcohólico de *F. citrifolia*



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En la **Tabla 17** se observa el valor de IC<sub>50</sub> del extracto alcohólico al 20% de *F. citrifolia* es 2,81 veces mayor al del té verde y 6,23 veces mayor al de la

vitamina C, 2,81 veces mayor a la del extracto alcohólico al 80% y 1,78 veces mayor a la del extracto alcohólico al 50% de la misma planta.

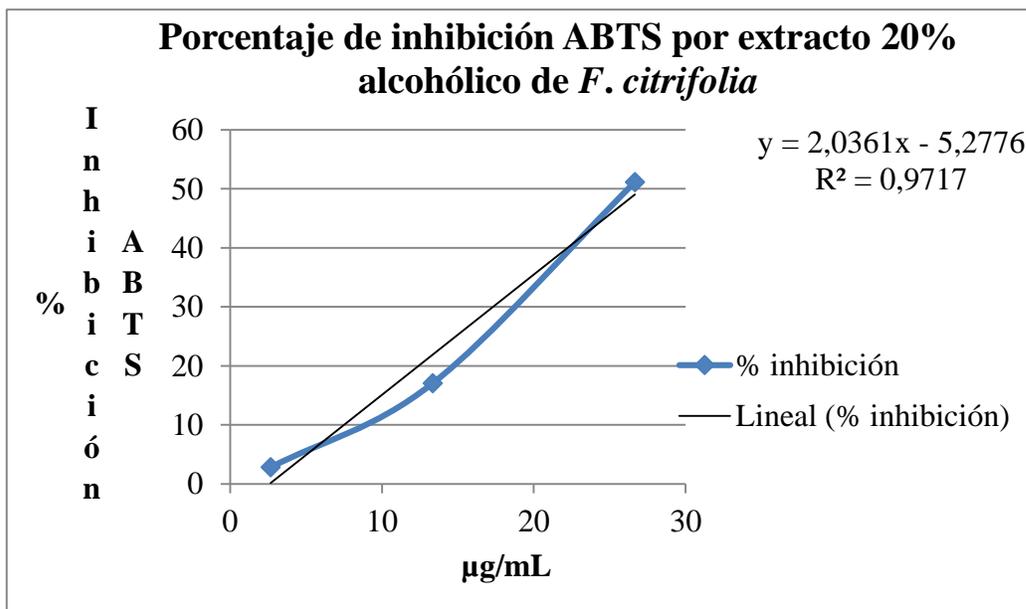
**Tabla 17.** Actividad antirradical (ABTS) del extracto alcohólico al 20% de *F. citrifolia*

Extracto 20% alcohólico de <i>F. citrifolia</i>								
$\mu\text{L}$ de Ext.	$\mu\text{g/mL}$	Absorbancia 734 nm					Promedio	Inh. (%)
20	26,667	0,21	0,187	0,169	0,157	0,144	0,173	51,160
10	13,333	0,425	0,415	0,406	0,4	0,396	0,408	17,052
2	2,667	0,522	0,51	0,504	0,5	0,496	0,506	2,829
0	0,000	0,524	0,52	0,519	0,517	0,516	0,519	0
							<b>IC<sub>50</sub> <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>27,149</b>

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 14** muestra el comportamiento de la actividad antirradical del extracto alcohólico al 20% de *F. citrifolia*, evidenciando la menor actividad antioxidante frente a los extractos con mayor concentración alcohólica.

**Gráfico 14.** Porcentaje de inhibición ABTS por extracto 20% alcohólico de *F. citrifolia*



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

Finalmente tenemos el extracto acuoso de *F. citrifolia*, que al igual que en ensayo de DPPH, demuestra el valor más alto de IC<sub>50</sub> (**Tabla 18**) y por tanto menor actividad antioxidante. Dicho valor es 5,31 veces mayor al del té verde, 11,35 veces mayor al de la vitamina C, 5,11 veces mayor a la del extracto alcohólico al 80%, 3,24 veces mayor a la del extracto alcohólico al 50% y 1,82 veces mayor a la del extracto alcohólico al 20% de la misma planta.

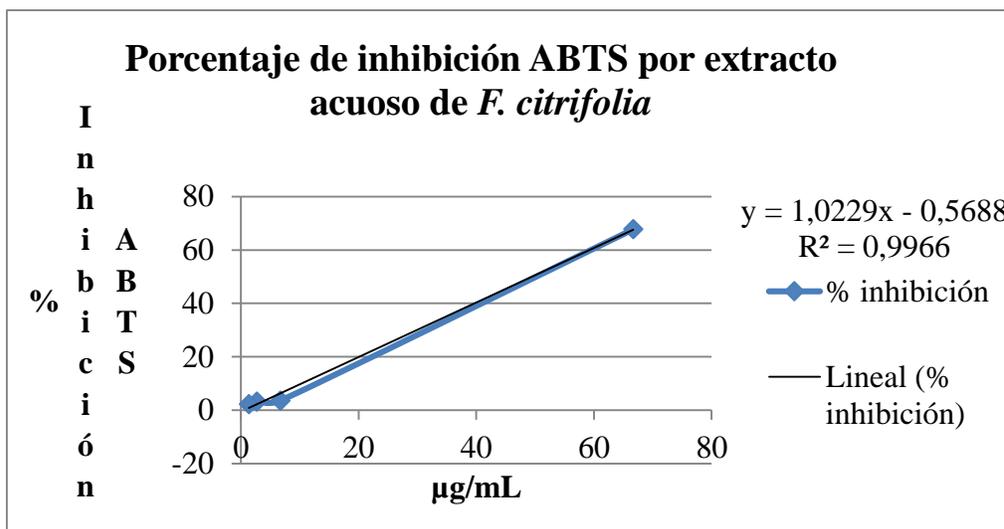
**Tabla 18.** Actividad antirradical (ABTS) del extracto acuoso de *F. citrifolia*

Extracto acuoso de <i>F. citrifolia</i>								
μL de Ext.	μg/mL	Absorbancia 734 nm					Promedio	Inh. (%)
50	66,667	0,07	0,057	0,048	0,042	0,036	0,051	67,823
5	6,667	0,496	0,492	0,489	0,487	0,485	0,490	3,518
2	2,667	0,497	0,494	0,491	0,489	0,488	0,492	3,225
1	1,333	0,504	0,5	0,497	0,496	0,495	0,498	2,259
0	0,000	0,504	0,508	0,51	0,505	0,51	0,507	0
							<b>IC<sub>50</sub> μg/mL</b>	<b>49,437</b>

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En el **Gráfico 15** muestra el comportamiento de la actividad antirradical del extracto alcohólico al 20% de *F. citrifolia* y confirma la actividad antioxidante menor frente a los extractos menos polares y la de sus estándares.

**Gráfico 15.** Porcentaje de inhibición ABTS por extracto acuoso de *F. citrifolia*

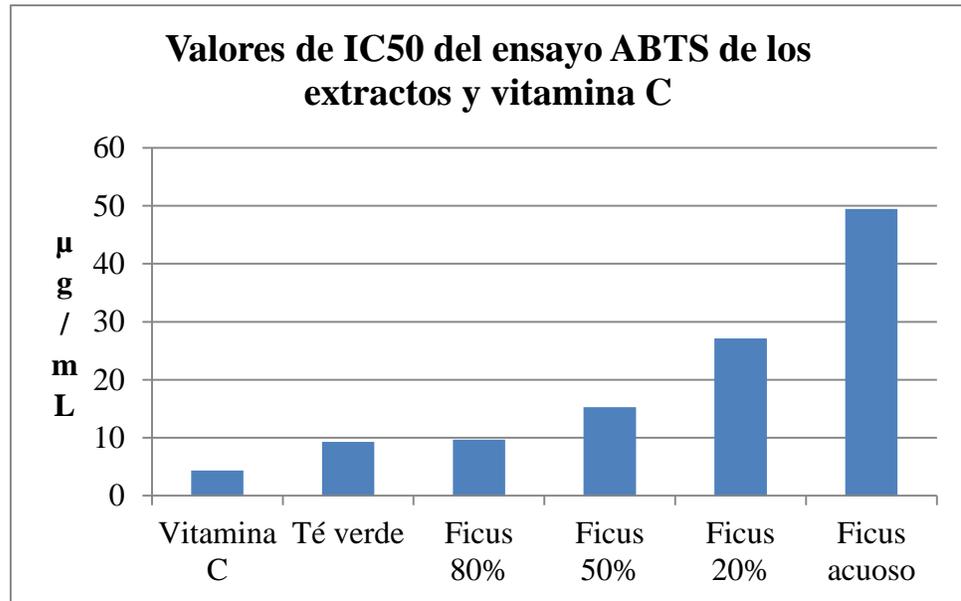


**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

En las tablas anteriores se demuestra una correlación entre la cantidad de fenoles y flavonoides totales y la actividad antioxidante de cada extracto, por ejemplo los valores del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* demostró el valor más bajo de IC<sub>50</sub> y el más alto de fenoles y flavonoides totales. El valor de IC<sub>50</sub> más alto es el del extracto acuoso, como era de esperarse, debido a la naturaleza química de los polifenoles que se disuelven mejor en alcohol.

En el **Gráfico 16** se evidencia la diferencia entre los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en el ensayo de ABTS para cada uno de los extractos. Las diferencias entre extractos y estándares es más corta que la reportada por el ensayo DPPH.

**Gráfico 16.** Valores de IC<sub>50</sub> de vitamina C y los extractos de *F. citrifolia* y té verde.



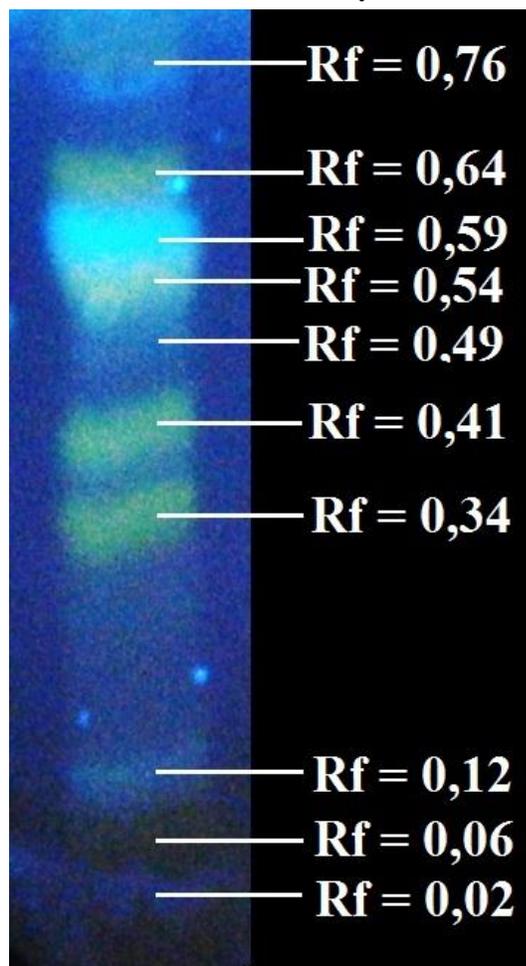
**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

#### 4.4 Cromatografía Capa fina

Se utilizó únicamente el extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* para realizar la cromatografía de capa fina (TLC), puesto que se demostró que posee mayor cantidad de flavonoides y mayor actividad antioxidante y la diferencia con el extracto acuoso era evidente y no tenía sentido su comparación.

El **Gráfico 17** muestra la separación cromatográfica del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia*, observado en la cámara de luz UV a 366 nm, incluyendo los R<sub>f</sub> de sus correspondientes manchas. Con el objeto de estandarizar los valores de R<sub>f</sub>, se utiliza el valor de 10 como denominador en dichos cálculos.

**Gráfico 17.** Placa cromatográfica del extracto alcohólico al 80% de *F. citrifolia* revelada con cloruro de aluminio y observada a 366 nm.

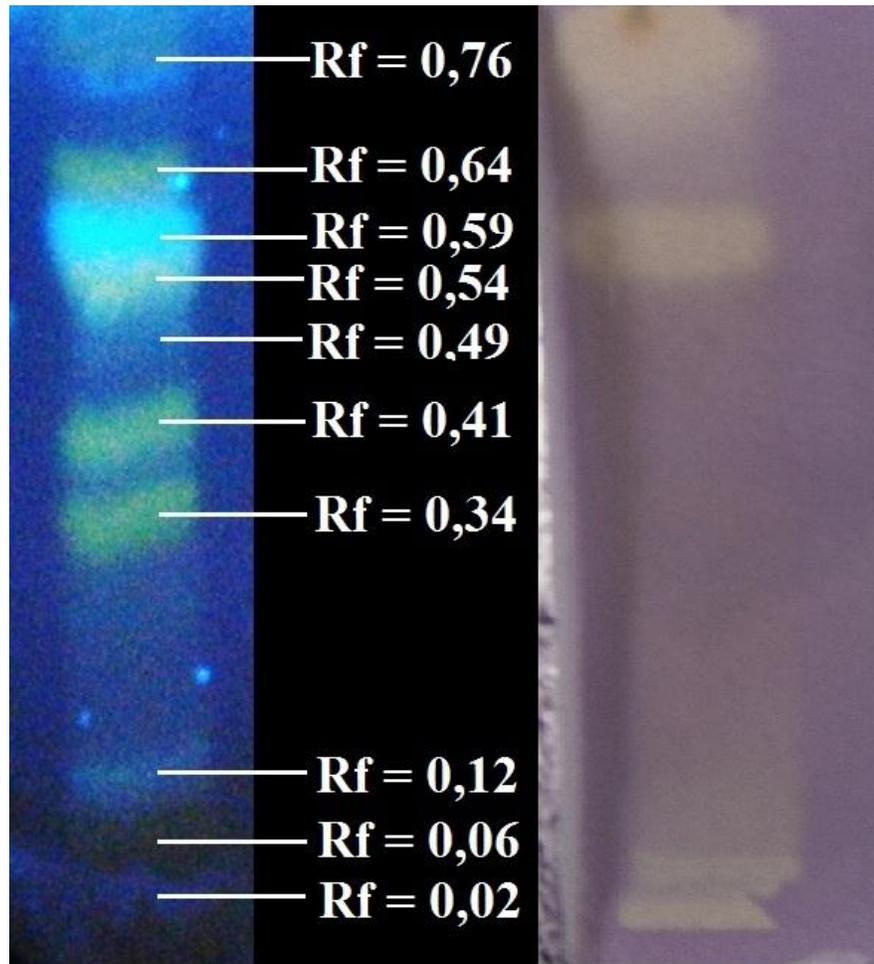


**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

Se observan nueve manchas coloreadas amarillas y azules de lo que se presumen son flavonoides, pero no contamos con estándares para realizar el contraste necesario y determinar a qué compuesto pertenece cada una de ellas.

En el **Gráfico 18** se presenta la placa cromatográfica de *F. citrifolia* presentada en el **Gráfico 17** combinado a su lado derecho, con la placa que fue rociada con la solución etanólica de DPPH al 0,5%. En éste se aprecia cuatro manchas que se volvieron transparentes con intensidad al instante del rociado, demostrando buena actividad antioxidante.

**Gráfico 18.** Placa cromatográfica del extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia* rociada con DPPH.



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

En el **Gráfico 19** se muestra la placa cromatográfica con el extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia*, un minuto después del rociado con la solución de DPPH. Se observa claramente que todo el recorrido de la muestra se ha vuelto transparente mientras los bordes mantienen el color azulado propio del DPPH, demostrando que el resto de componentes del extracto también poseen actividad antioxidante aunque menor que las cuatro presentadas en el **Gráfico 18**.

**Gráfico 19.** Placa cromatográfica del extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia* un minuto después de ser rociada con DPPH.



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

Se realizó la separación por TLC únicamente al extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia* debido a que demostró tener la mayor actividad antioxidante, corroborando lo señalado en varios estudios que aseveran que regularmente los extractos orgánicos polares tienen de 3 a 4 veces más fenoles totales que los extractos acuosos (Moreno S., 2006, pág. 230) y por tanto, también tienen menos flavonoides.

#### 4.5 Análisis estadístico

Mediante el programa estadístico InfoStat versión libre 2009, se realizaron cuatro ANOVA para contrastar los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos a partir de los ensayos DPPH y ABTS de los extractos de *F. citrifolia*, té verde y vitamina C, así como los valores de fenoles y flavonoides totales. Posteriormente se realizó una prueba de Tukey para hallar diferencias significativas entre los extractos alcohólicos y acuoso. En los **Gráficos 20 y 21** se aprecian las tablas de datos del programa con sus respectivos conglomerados al lado derecho de cada uno. Dichos conglomerados son necesarios para realizar un ANOVA y se generan por InfoStat como criterio de división. Éstos presentan números correspondientes a grupos con datos con cierta homogeneidad, de manera que todos los datos que presenten el mismo número pertenecen a un grupo.

**Gráfico 20.** Tabla de datos de IC<sub>50</sub> de DPPH y ABTS en el programa InfoStat.

Caso	Extractos y solución	DPPH IC50	C. DPPH	ABTS IC50	C. ABTS
1	Vitamina C	23,584	1	4,357	1
2	Té verde	258,626	1	9,317	1
3	Ficus 80%	380,341	1	9,677	1
4	Ficus 50%	434,004	1	15,248	1
5	Ficus 20%	484,478	1	27,149	2
6	Ficus acuoso	1298,979	2	49,437	2

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

Se realizaron dos tablas de datos en InfoStat, una que contiene los datos de la actividad antioxidante evaluada mediante DPPH y ABTS (**Gráfico 20**), que incluye a la vitamina C, al extracto 50% alcohólico de té verde y los extractos alcohólicos y acuosos de *F. citrifolia*, y otra que contiene los datos de los fenoles y flavonoides totales por lo que no incluye a la vitamina C (**Gráfico 21**).

**Gráfico 21.** Tabla de datos de fenoles y flavonoides totales en el programa InfoStat.

Caso	Extracto	Fenoles T.	C. Fenoles	Flavonoides T.	C. Flavonoides
1	Té verde	30,354	2	7,706	2
2	Ficus 80%	22,728	2	9,198	2
3	Ficus 50%	18,112	2	5,774	1
4	Ficus 20%	9,383	1	4,382	1
5	Ficus acuoso	7,634	1	3,393	1

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

A pesar de que los datos de las tablas están relacionados por pertenecer a los mismos extractos, fue necesario generar un conglomerado para cada una de las variables puesto que cada una se obtuvo de ensayos diferentes, con reactivos y condiciones diferentes y que requieren un ANOVA individual que facilite resultados más precisos. Cada ANOVA necesita de una hipótesis alternativa y una nula, de manera que se citará la hipótesis que se acepta debajo de cada gráfico.

#### 4.5.1 DPPH

En el **Gráfico 22** se detallan los valores del ANOVA entre los valores de  $IC_{50}$  obtenidos en el ensayo de DPPH. El valor de  $p$  es 0,0082 ( $<0,05$ ) por lo que se acepta la hipótesis alternativa que dice: La actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de *F. citrifolia* poseen diferencias significativas entre sí. De hecho la actividad antioxidante de los extractos alcohólicos es mayor.

En el conglomerado correspondiente (**Gráfico 20**) se observan 2 grupos. Por un lado se ubica al extracto acuoso y por otro, se tienen los demás extractos alcohólicos de *F. citrifolia*, el extracto 50% alcohólico del té verde y la vitamina C, de manera que la actividad antioxidante de éstos últimos es estadísticamente similar.

Al demostrar similitud estadística entre la actividad antioxidante del té verde y la vitamina C con *F. citrifolia*, se puede concluir que los extractos alcohólicos de *F. citrifolia* poseen actividad antioxidante significativa.

**Gráfico 22** Cuadro de análisis de la varianza, método DPPH.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
DPPH IC50	6	0,86	0,82	38,31

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	804867,99	1	804867,99	23,80	0,0082
C. DPPH	804867,99	1	804867,99	23,80	0,0082
Error	135248,22	4	33812,06		
Total	940116,22	5			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=482,89665**

Error: 33812,0561 gl: 4

C. DPPH	Medias	n	
1	316,21	5	A
2	1298,98	1	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

#### 4.5.2 ABTS

En el **Gráfico 23** se detallan los valores del ANOVA entre los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en el ensayo de ABTS. El valor de p es 0,0196 ( $<0,05$ ) por lo que se acepta la hipótesis alternativa que dice: La actividad antioxidante de los extractos alcohólicos y acuoso de *F. citrifolia* poseen diferencias significativas entre sí. De hecho la actividad antioxidante de los extractos alcohólicos es mayor.

Ocurre algo un poco diferente al ensayo de DPPH, puesto que en el conglomerado de DPPH (**Gráfico 20**) se agrupaba a todos los extractos alcohólicos con los estándares en un grupo y al extracto acuoso en otro, mientras que en el conglomerado del ABTS se incluye en un grupo a los extractos acuoso y 20% alcohólico de *F. citrifolia*. Sin embargo se refuerza el hecho de que la actividad antioxidante de los extractos con mayor contenido

alcohólico son estadísticamente similares al extracto 50% alcohólico de té verde y a la vitamina C y por tanto poseen actividad antioxidante significativa.

**Gráfico 23** Cuadro de análisis de la varianza, método ABTS

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABTS IC50	6	0,78	0,73	45,70

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1093,91	1	1093,91	14,21	0,0196
C. ABTS	1093,91	1	1093,91	14,21	0,0196
Error	307,84	4	76,96		
Total	1401,76	5			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=20,48438**

Error: 76,9606 gl: 4

C. ABTS	Medias	n	
1	9,65	4	A
2	38,29	2	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

### 4.5.3 Fenoles Totales

En el **Gráfico 24** se detallan los valores del ANOVA entre los valores obtenidos en el ensayo de Folin-Ciocalteu para fenoles totales. El valor de p es 0,0467 ( $<0,05$ ) por lo que se acepta la hipótesis alternativa que dice: La cantidad de fenoles totales de los extractos alcohólico y acuoso de *F. citrifolia*. poseen diferencias significativas entre sí. De hecho la cantidad de fenoles totales de los extractos alcohólicos es mayor.

El conglomerado de fenoles totales es igual al generado para el ensayo de ABTS, teniendo por un lado a los extractos 20% alcohólico y acuoso de *F. citrifolia* y por el otro a los demás extractos, concluyendo que los extractos con mayor contenido alcohólico de *F. citrifolia* poseen cantidades de polifenoles estadísticamente similares al extracto 50% alcohólico del té verde, y por consiguiente, son significativas.

**Gráfico 24.** Cuadro de análisis de varianza para fenoles totales.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Fenoles T.	5	0,78	0,71	28,90

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	278,08	1	278,08	10,70	0,0467
C. Fenoles	278,08	1	278,08	10,70	0,0467
Error	77,97	3	25,99		
Total	356,05	4			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14,66163**

Error: 25,9909 gl: 3

C. Fenoles	Medias	n	
1	8,51	2	A
2	23,73	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

#### 4.5.4 Flavonoides Totales

En el **Gráfico 25** se detallan los valores del ANOVA entre los valores obtenidos para flavonoides totales. El valor de p es 0,0332 ( $<0,05$ ) por lo que se acepta la hipótesis alternativa que dice: La cantidad de flavonoides totales de los extractos alcohólico y acuoso de *F. citrifolia* poseen diferencias significativas entre sí. De hecho la cantidad de fenoles totales del extracto 80% alcohólico es mayor.

El conglomerado de flavonoides totales es diferente a los demás, puesto que incluye en un grupo sólo al extractos alcohólicos al 50% de té verde y al 80% de *F. citrifolia* y en otro a los demás. Se concluye que la cantidad de flavonoides de los dos primeros extractos es estadísticamente similar y por tanto el extracto 80% alcohólico de *F. citrifolia* es significativo.

**Gráfico 25.** Cuadro de análisis de varianza para flavonoides totales.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Flavonoides T.	5	0,82	0,77	18,90

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18,59	1	18,59	14,03	0,0332
C. Flavonoides	18,59	1	18,59	14,03	0,0332
Error	3,97	3	1,32		
Total	22,56	4			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,31026**

Error: 1,3249 gl: 3

C. Flavonoides Medias n

1	4,52	3	A
2	8,45	2	B

*Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)*

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

## CONCLUSIONES

- Todos los extractos evaluados (alcohólicos y acuoso) de *Ficus citrifolia*, presentaron actividad antioxidante en diferente medida así como la presencia de polifenoles, entre ellos flavonoides.
- Los valores obtenidos de fenoles totales, para los extractos de *Ficus citrifolia*, en equivalentes de mg GAE/ml fueron: 22,728 para el extracto alcohólico al 80% , 18,112 para el extracto alcohólico al 50%, 9,383 para el extracto alcohólico al 20% y 7,634 para el extracto acuoso.
- Los extractos de *Ficus citrifolia* que presentaron mayor contenido de flavonoides fueron los extractos alcohólicos al 80% y 50% con valores de 9,198 y 5,774 equivalentes a mg de hiperósido/ml, respectivamente. Incluso el primero, demostró ser mayor que el valor obtenido para el extracto alcohólico al 50% de té verde.
- Mediante los ensayos de DPPH y ABTS, se demostró que los extractos alcohólicos de *Ficus citrifolia* presentaron mayor actividad antioxidante que el extracto acuoso, obteniéndose valores de IC<sub>50</sub> muy cercanos a los obtenidos del extracto alcohólico al 50% té verde e incluso se comprobó que son estadísticamente similares y por tanto significativos .
- A pesar de que el extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* presentó mayor contenido de flavonoides que el extracto alcohólico al 50% de té verde, su actividad antioxidante fue ligeramente menor, lo que demuestra que los flavonoides de éste último fueron más eficaces en la captación de radicales libres.
- Mediante el roció de DPPH en una placa de TLC se determinó que, por lo menos existen cuatro compuestos con alta actividad antioxidante presentes en el extracto 80% alcohólico de *F citrifolia*.

## RECOMENDACIONES

- El presente es un estudio inicial acerca de la actividad antioxidante de *Ficus citrifolia*, por cuanto se recomienda continuar con estudios futuros, especialmente en la identificación y caracterización química de los compuestos que demostraron mayor actividad antioxidante.
- Se deben tomar con cautela los valores obtenidos en los ensayos de DPPH y ABTS, por cuanto no demuestran la actividad antioxidante real, sin embargo son válidos puesto que permiten apreciar dicha propiedad a nivel experimental.
- El uso de plantas con probada actividad antioxidante, como estándares naturales, es una buena forma de apreciar dicha actividad en los vegetales, ya que en una planta interactúan un sinnúmero de compuestos que intervienen en la efectividad al captar radicales. Además, que complementa el uso de otros estándares como la vitamina C, obteniendo datos más completos y apegados a la realidad.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Abbott, D. &. (1970). Introducción a la Cromatografía. *Brooks/Cole*, 34(3), 5-14.
- Andriambelason, E. M.-a. (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutr.*, 128(1), 2324-2333.
- Aquino R., M. S. (2001). Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. *J. Nat. Prod.*, 64, 1019-1023.
- Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11(2), 419-421.
- Ávila, Z. G. (2001). Química Orgánica. Experimentos con un enfoque ecológico. *J. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM*, 2(1), 1-4.
- Benthath A, R. S.-G. (2008). Flavonoids in health and Disease. En *Vitamin nature of flavona* (págs. 137-161). New York: Marcel Dekker.
- Bisset, N. G. (1994). Herbal drug and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientist basis. *Medpharm Scientific Publishers*.
- Boelcke, O. y. (1987). *Plantas vasculares de la Argentina, nativas y exóticas* (Vol. II). Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur S.A.
- Bomman, J. (1999). Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol.*, 95, 393-397.
- Brand-Williams, W. C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wis. Technol.*, 22(7), 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutrition significance. *Nutr. Rev.*, 56(11), 317-333.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales* (Segunda ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Cadena, R. P.-E. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med*, 26, 1231-1237.
- Cao, G. S. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Biol med*, 22(1), 749-760.
- Chipault, J. R. (1962). Antioxidants for food use. *Wiley*, 447-542.
- Davis, J. K. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 1-31.
- Delmas, D. R.-m.-d. (2003). Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death inducing signaling complex in colon cancer cells. *Biol Chem*, 278(34), 41482-41490.
- Dolabela, M. F. (1997). Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, productos naturais e substâncias sintéticas. *Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFMG*, 21(3), 130.
- Escarpa A, G. M. (2001). An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic compounds in food. *Crit. Rev. Anal. Chem*, 31, 57-139.
- Evans, W. C. (2011). *Pharmacognosy* (14<sup>a</sup> Ed ed.). London, U. K.: WB Saunder.
- Fessenden, R. &. (1993). Organic Laboratory Techniques. *Brooks/Cole*, 24(1), 34-41.
- Fogliano, V. V. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem*, 47(4), 1035-1040.
- Gordon M., H. (2001). El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. En J. Y. Pokorny, *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (págs. 7-21). Zaragoza: Acribia.

- Hammond, C. (1999). Experimental Organic Techniques. *Freeman*, 7(3), 24-35.
- Harling, G. &. (2009). Flora of Ecuador. *Department of Plant and Environmental Sciences, University of Gothenburg*, 12(3), 76-81.
- Hill, A. E. (1965). *Botánica económica. Plantas útiles y productos vegetales*. Omega.
- Imeh, U. &. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem*, 50(3), 6301- 6306.
- Jun, X. S. (2010). Separation of major catechins from Green tea by ultrahigh pressure extraction. *Int J Pharm*, 229-231.
- Kim YJ, H. M. (1997). Chemoprotective effect of quercetin and its glycosides against oxidative DNA damage and cytotoxicity. *Environ Molec Mutag*, 29(28), 26.
- Kim, D. L. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem*, 50(2), 3713-3717.
- Kuskoski, E. A.-P. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim*, 24(4), 691-693.
- Martínez-Valverde I., P. M. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer. Nutr*, 50, 5-18.
- McMurry, J. (2001). *Química Orgánica* (Quinta edición internacional ed.). México: Editorial Thompson.
- Middleton E. Jr., K. C. (1994). *The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer*. London: Chapman and Hall.
- Migdalia, M. (2002). *Métodos de análisis de drogas y extractos*. Habana, Cuba: Universidad de la Habana.
- Miller, N. R.-E. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sciences*, 84(2), 407-412.

- Moreno S., S. T. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Res*, 40, 223-231.
- Nakagawa, T. &. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 1745-1750.
- Namiki, M. (1990). Antioxidants / antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29, 273–300.
- Olson, J. A. (1996). The bioavailability of dietary carotenoids. *Paper presented at the XVII IVACG Meeting*, 1-4.
- Palomino, O. (2001). *Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales*. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
- Pannala, A. C.-e. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Com*, 282(61), 1161-1168.
- Pinelo, M. M. (2004). Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem*, 52(5), 1177-1180.
- Prior, R. &. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med*, 27(1), 11-12, 1173-1181.
- Publicorb*. (22 de Marzo de 2008). Recuperado el 2013, de Naturaleza. En Huerto y jardín: <http://www.publicorb.es/cir/naturaleza/huertoyjardin/ficus.htm>.
- Rajan, M. K. (2012). Antioxidant, anti-inflammatory activity, and phytochemical constituents of ficus (*Ficus amplissima* Smith) bark. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 59-67.
- Ramos, E. C. (2008). .Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Perú Salud*, 15(1).
- Re, R. P.-E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(5), 1231-1237.

- Rice-Evans C. (1995). Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes: In Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Portland Press*, 1-32.
- Rice-Evans, C. M. (1996 ). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, 20(5), 933-956.
- Rizner Hras, A. H. (2000). Comparision of antioxidative and synergistic egeects of rosemary extraction with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71, 229-333.
- Roberts, W. &. (2003). Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *J. Agric. Food Chem*, 51(2), 1486-1493.
- Roginsky V., L. E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92, 235-254.
- Rotman, A. (1987). Moraceae. En T. N. M., *Entre Ríos* ( 6(3a) ed., págs. 22-31). Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.
- Sakakibara, H. H. (2003). Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chem*, 51, 571-581.
- Salas, R. C. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de heliocarpus terebinthinaceus. *Universidad tecnológica de la mixteca*, 1-5.
- Scartezzini, P. A. (2006). Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 113-118.
- Solomon A, G. S. (2006). Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L.). *J Agric Food Chem.*, 54(23), 7717-7723.
- Troncoso, A. G. (2003). Capacidad antioxidante del chimichurri y sus componentes., *I*(4), 42-49.

- Wang, J. y. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 50, 4183-4189.
- Wang, M. L. ((1998).). Antioxidant phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 4869-4873.
- Yanishleva-Maslarova N.V., H. I. (2001). Origen de los antioxidantes naturales: verduras, frutas, hierbas, especias y tés. En J. Y. Pokorny, *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (págs. 119-247). Zaragoza: Acribia.

## ANEXOS

### Anexo 1. Lista de abreviaturas

<b>Ha</b>	Hipótesis alternativa
<b>Ho</b>	Hipótesis nula
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril hidrazilo
<b>ABTS</b>	ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>Ufc</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RL</b>	Radicales libres
<b>QAP</b>	Herbario Alfredo Paredes
<b>UPS</b>	Universidad Politécnica Salesiana
<b>(SOD)</b>	Superóxido dismutasa
<b>(CAT)</b>	Catalasa
<b>(GPx)</b>	Glutación peroxidasa
<b>(GSH)</b>	Glutación reducido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteu

<b>UV/vis</b>	Luz ultravioleta visible
<b>TSA</b>	Trypticase Soy Agar (agar de soja Trypticase)
<b>TSB</b>	Trypticase Soy Broth (caldo tripticasa soya)
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración necesaria para disminuir en un 50% la actividad antioxidante
<b>Ext.</b>	Extracto
<b>Inh.</b>	Inhibición
<b>Ppm</b>	Partes por millón

**Anexo 2.** Fotografía de la certificación de la planta *Ficus citrifolia*



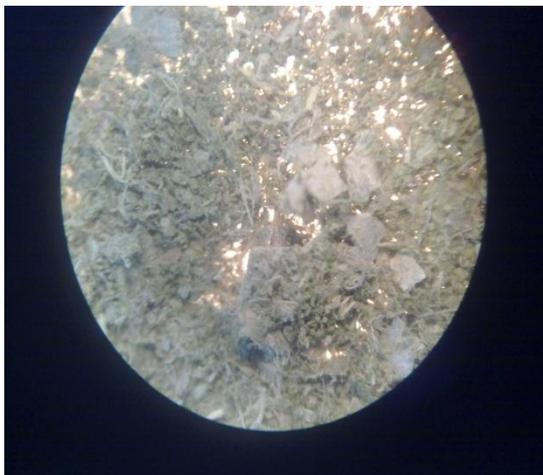
**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Anexo 3.** Fotografías de la recolección de la planta en Tulipe (Pichinhca).



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

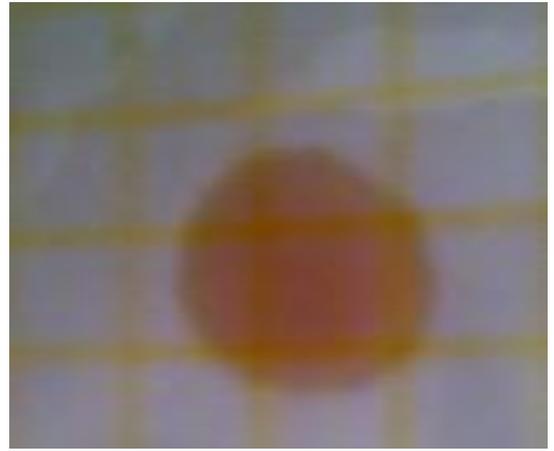
**Anexo 4.** Proceso del análisis de las drogas: materias extrañas



<b>Materias extrañas</b>		
<b>M. extraña (g)</b>	<b>Droga (g)</b>	<b>M. extraña (%)</b>
0	5	0
0,1923	5	3,846
0	5	0
<b>Promedio</b>		1,282
<b>Desv. estándar</b>		2,220

**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Anexo 5.** Método de análisis de las drogas: análisis microbiológico



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Anexo 6.** Método de análisis de las drogas: cenizas



<b>Cenizas</b>						
<b># de Cisoles</b>	<b>Crisol (g)</b>	<b>Droga (g)</b>	<b>droga+crisol (g)</b>	<b>Crisol+ceniza (g)</b>	<b>Cenizas totales (%)</b>	<b>C. solubles en agua (%)</b>
1	21,1412	2,5013	23,6425	21,3616	8,81	1,02
2	23,3136	2,5033	25,8169	23,5321	8,73	1,55
3	18,1105	2,5018	20,6123	18,3293	8,75	1,36
<b>Promedio</b>					8,76	1,31
<b>Desv. estándar</b>					0,042	0,269

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Anexo 7. Método de análisis de las drogas: agua residual (humedad)**

<b># Cápsula</b>	<b>Promedio de peso (g)</b>	<b>Peso de la droga (g)</b>	<b>Peso (droga+cápsula)</b>	<b>Peso de droga desecada</b>	<b>% Humedad</b>
1	28,6236	2,0023	30,6259	30,4376	9,403
2	25,9885	2,0034	27,9919	27,8008	9,537
3	26,2698	2,001	28,2708	28,0822	9,424
<b>Promedio</b>					9,454
<b>Desv. Estándar</b>					0,072

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Anexo 8. Método de análisis de las drogas: sólidos solubles**

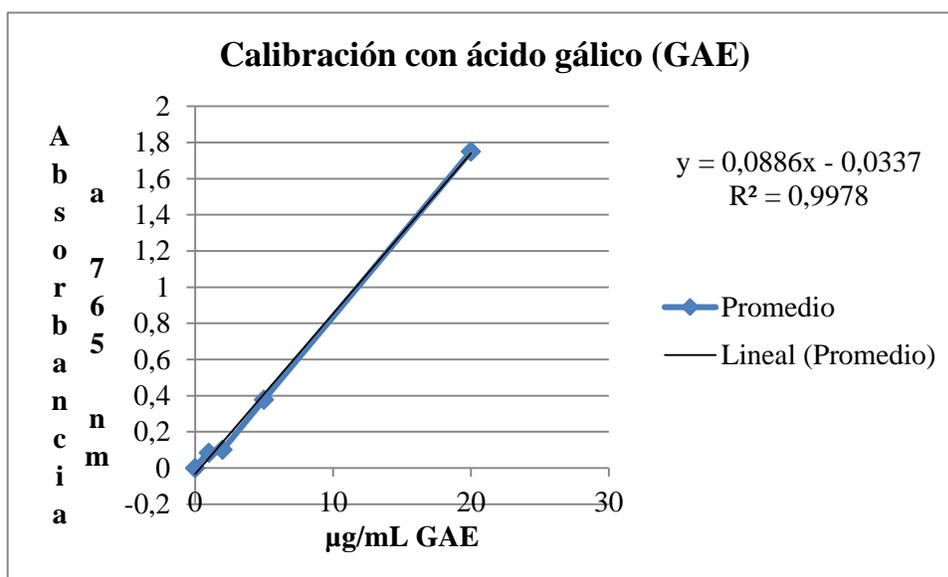
<b>Sólidos extraíbles</b>			
<b>Muestra (g)</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Residuo (g)</b>	<b>Sólidos solubles (%)</b>
5	9,46	0,3081	34,03
5	9,46	0,3072	33,93
5	9,46	0,2892	31,94
<b>Promedio</b>			33,3
<b>Desv. Estándar</b>			1,179

Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín

**Anexo 9.** Curva de calibración para fenoles totales con GAE (tabla y gráfico).

<b>Calibración con ácido gálico (GAE)</b>				
<b>µg/mL GAE</b>	<b>Absorbancia a 765 nm</b>			<b>Promedio</b>
0	0	0	0	0
1	0,083	0,083	0,085	0,084
2	0,102	0,102	0,104	0,103
5	0,378	0,378	0,376	0,377
20	1,75	1,75	1,75	1,750

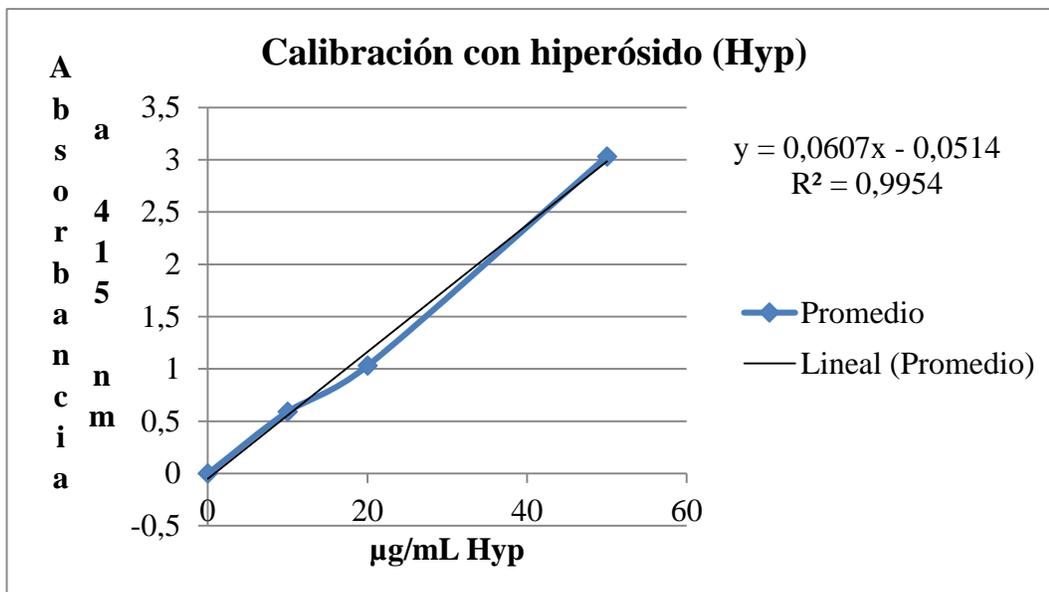
**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

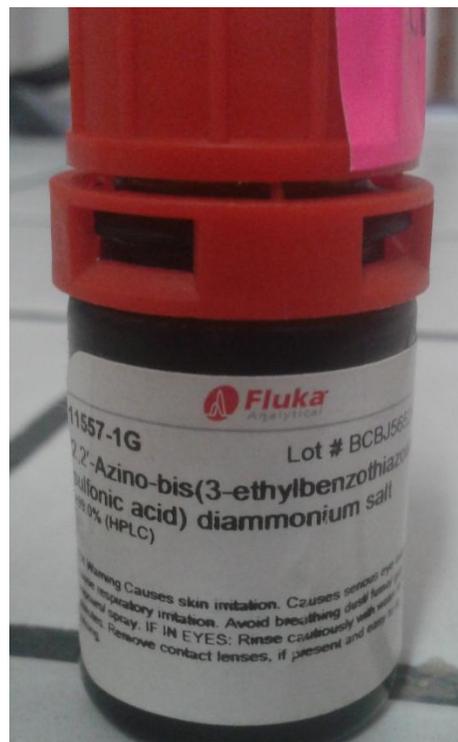
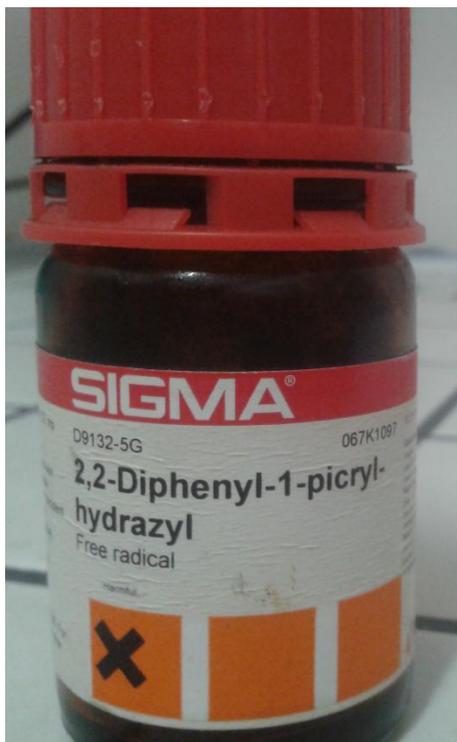
**Anexo 10.** Curva de calibración para flavonoides totales con hiperósido (tabla y gráfico)

<b>Calibración con hiperósido (Hyp)</b>				
<b>µg/ml Hyp</b>	<b>Absorbancia a 415 nm</b>			<b>Promedio</b>
0	0	0	0	0
10	0,585	0,59	0,6	0,592
20	1,018	1,03	1,043	1,030
50	3,002	3,047	3,047	3,032



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

### Anexo 11. Radicales DPPH y ABTS



Elaborado por: Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

**Anexo 12.** Espectrofotómetro UV (marca Shimadzu y modelo UV mini 1240)



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.

**Anexo 13.** Cromatógrafo (marca CAMAG y modelo Linomat 5)



**Elaborado por:** Cristian Aldana y Lorena Guayasamín.