

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS FLAVONOIDES PRESENTES EN
Ficus citrifolia Mill.**

AUTORA:

KATIC TAMIANA GARCIA ALVARADO

DIRECTOR:

PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA

Quito, mayo del 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Quito, mayo del 2015

Katic Tamiana García Alvarado

CI: 171195606-8

“Si he hecho descubrimientos invaluable ha sido más por tener paciencia que cualquier otro talento.”

Isaac Newton

“Realmente soy un soñador práctico; mis sueños no son bagatelas en el aire. Lo que yo quiero es convertir mis sueños en realidad.”

Mahatma Gandhi

A mi familia

(Jhony, Mercy y Tiani)

A mis sueños

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Politécnica Salesiana y a la Carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales, por la formación académica y por la oportunidad de descubrir nuevos espacios y crear nuevos sueños.

A mi tutor Paco Noriega, por la confianza, el tiempo y la oportunidad de trabajar con él.

A la Dra. María Elena Maldonado, por el tiempo para la lectura y revisión de la tesis.

A todos los profes de la carrera de biotecnología. A Wilson Tapia, Germania Karolys y Diana Calero por su amistad, apoyo y consejos durante estos años.

A mi familia, por su ejemplo, enseñanzas, apoyo, libertad y amor que me brindaron desde siempre. Gracias por el arte y la música.

A mis compañeros y amigos: Yamis, Thaly, Angy, Pao, Gaby y Willy por su compañía y su amistad incondicional, por los buenos momentos, por las metas individuales y grupales que hemos conseguido. A Xime Haro y Andrea Culqui por su luz. A Daniel por siempre aparecer.

Al Mtro. Cesitar, por el amor y los abrazos compartidos, por el redescubrir y por el canto.

A Samir, por tu amistad, por lo compartido y aprendido en este tiempo; y por lo que aún queda por hacer.

Gracias a los profes y compañeros de la carrera de Educación Intercultural Bilingüe y a quienes me acompañaron en el proceso de la FEUPS, a los chicos del coro de la CCE, a los compas y chicos del CEEAL.

A todas las personas que vinieron a mi vida y que me han acogido con cariño y alegría, de todos llevo aprendizajes.

A la vida, por darme la oportunidad a ser feliz y siempre soñar.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
ANTECEDENTES	3
1.1 Tema.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Justificación.....	4
CAPÍTULO 2	
MARCO TEÓRICO	6
2.1 <i>Ficus citrifolia</i> Mill.....	6
2.1.1 Familia Moraceae.....	6
2.1.1.1 Características generales	6
2.1.1.2 Diversidad	6
2.1.1.3 Distribución.....	7
2.1.2 Género Ficus	7
2.1.2.1 Características generales	7
2.1.2.2 Diversidad	8
2.1.2.3 Distribución.....	8
2.1.3 <i>Ficus citrifolia</i> Mill.....	9
2.1.3.1 Características generales	9
2.1.3.2 Distribución.....	10
2.2 Usos	12
2.2.1 Usos del género Ficus	12
2.2.2 Usos de <i>Ficus citrifolia</i> Mill.	13
2.3 Estudios fitoquímicos.....	14
2.3.1 Estudios fitoquímicos del género Ficus	14
2.3.2 Estudios fitoquímicos en <i>Ficus citrifolia</i> Mill.	15

2.4 Flavonoides	15
2.4.1 Origen biosintético	16
2.4.2 Distribución.....	16
2.4.3 Localización	17
2.4.4 Estructura	17
2.4.5 Clasificación.....	18
2.4.6 Propiedades	19
2.5 Actividad terapéutica de los flavonoides	19
2.5.1 Flavonoides como antioxidantes	22
2.5.1.1 Actividad antioxidante en plantas	23
2.6 Técnicas para identificación de flavonoides	24
2.6.1 Cromatografía de Capa Fina (TLC)	24
2.6.2 Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV-Vis).....	25
2.6.3 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	25
2.6.4 Espectrometría de Masas	26

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO	28
3.1 Elaboración de extractos	28
3.2 Cromatografía de capa fina (TLC).....	28
3.3 TLC autobiográfica con solución de 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH).....	30
3.4 Identificación de flavonoides mediante TLC.....	31
3.5 Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)	32

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Elaboración de extractos	34
4.2 Cromatografía de capa fina (TLC).....	34
4.3 TLC autobiográfica con DPPH.....	35
4.4 Identificación de flavonoides mediante TLC	36
4.5 Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD).....	40

4.6 Identificación de flavonoides en <i>Ficus citrifolia</i> Mill.....	42
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES	46
LISTA DE REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad farmacológica de los flavonoides.....	20
Tabla 2. Actividad antioxidante de flavonoides.....	23
Tabla 3. Valores de Rf de las fracciones de <i>Ficus citrifolia</i> Mill.	35
Tabla 4. Primera placa TLC	38
Tabla 5. Segunda placa TLC	39
Tabla 6. Tercera placa TLC	40
Tabla 7. Tiempos de retención y picos máximos de absorción.....	41
Tabla 8. Identificación de flavonoides en <i>Ficus citrifolia</i> Mill.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la familia Moraceae.....	7
Figura 2. Género Ficus.....	9
Figura 3. <i>Ficus citrifolia</i> Mill.....	11
Figura 4. Distribución de <i>Ficus citrifolia</i> Mill.....	12
Figura 5. Origen biosintético de los flavonoides	16
Figura 6. Estructura de los flavonoides.....	17
Figura 7. Clasificación de los flavonoides	18
Figura 8. Factor de retardo de muestras	29
Figura 9. Placa TLC para <i>Ficus citrifolia</i> Mill.	34
Figura 10. Placa cromatográfica con DPPH	35
Figura 11. Primera placa cromatográfica	36
Figura 12. Segunda placa cromatográfica.....	37
Figura 13. Tercera placa cromatográfica	37

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Factor de retardo de muestras.....	29
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Lista de abreviaturas.....	55
Anexo 2. Cromatograma de la Primera fracción (Rf 1) de <i>Ficus citrifolia</i> Mill. (HPLC-DAD).....	55
Anexo 3. Cromatograma de la Segunda fracción (Rf 2) de <i>Ficus citrifolia</i> Mill. (HPLC-DAD).....	56
Anexo 4. Cromatograma de la Tercera fracción (Rf 3) de <i>Ficus citrifolia</i> Mill. (HPLC-DAD).....	56
Anexo 5. Cromatograma de la Cuarta fracción (Rf 4) de <i>Ficus citrifolia</i> Mill. (HPLC-DAD).....	57
Anexo 6. Cromatograma de la Quinta fracción (Rf 5) de <i>Ficus citrifolia</i> Mill. (HPLC-DAD).....	57
Anexo 7. Cromatograma de la Sexta fracción (Rf 6) de <i>Ficus citrifolia</i> Mill. (HPLC-DAD).....	58
Anexo 8. Cromatograma de luteolina (HPLC-DAD)	58
Anexo 9. Cromatograma de miricetina (HPLC-DAD)	59
Anexo 10. Cromatograma de kaenferol (HPLC-DAD)	59
Anexo 11. Cromatograma de hiperósido (HPLC-DAD).....	60
Anexo 12. Cromatograma de morina (HPLC-DAD)	60
Anexo 13. Cromatograma de naringina (HPLC-DAD)	61
Anexo 14. Cromatograma de silibina (HPLC-DAD).....	61
Anexo 15. Cromatograma de hidroxiflavona (HPLC-DAD).....	62
Anexo 16. Cromatograma de rutina (HPLC-DAD)	62
Anexo 17. Cromatograma de baicaleina (HPLC-DAD)	63
Anexo 18. Cromatograma de quercetina (HPLC-DAD).....	63
Anexo 19. Cromatograma de crisina (HPLC-DAD).....	64
Anexo 20. Cromatograma de diosmina (HPLC-DAD).....	64
Anexo 21. Cromatograma de daidzeina (HPLC-DAD)	65
Anexo 22. Cromatograma de epigallocatequina (HPLC-DAD)	65
Anexo 23. Cromatograma de genisteina (HPLC-DAD)	66
Anexo 24. Cromatograma de apigenina (HPLC-DAD).....	66
Anexo 25. Cromatograma de hesperidina (HPLC-DAD).....	67
Anexo 26. Cromatograma de naringenina (HPLC-DAD).....	67
Anexo 27. Cromatograma de catequina (HPLC-DAD)	68

RESUMEN

Ficus citrifolia Mill. pertenece a la familia Moraceae; es una planta nativa del Ecuador y ampliamente distribuida en el territorio; esta especie es utilizada en la medicina tradicional del pueblo shuar como antiinflamatorio y cicatrizante. Estudios fitoquímicos previos determinaron la presencia de flavonoides y alta actividad antioxidante en esta planta, por este motivo el presente estudio tuvo como objetivo la caracterización química de los flavonoides presentes en extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. mediante técnicas cromatográficas: cromatografía de capa fina (TLC) y **cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)**.

La cromatografía de capa fina (TLC) mostró siete fracciones de la muestra de *Ficus citrifolia* Mill. correspondientes a flavonoides, se calcularon los valores de Rf para las fracciones y los estándares de flavonoides. Además, se demostró una alta capacidad antioxidante para algunas fracciones mediante la TLC autobiográfica con una solución etanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) al 0,5%.

Mediante HPLC-DAD se obtuvieron los valores de tiempo de retención (min) y picos máximos de absorción (nm) para las fracciones de la muestra y los estándares de flavonoides, obteniendo coincidencias para la primera, segunda y sexta fracción. Al analizar los resultados se identificó la presencia de rutina (primera fracción – Rf 1), hiperósido (segunda fracción – Rf 2) y luteolina (sexta fracción – Rf 6) en el extracto de *Ficus citrifolia* Mill., confirmando así su potencial antiinflamatorio.

ABSTRACT

Ficus citrifolia Mill. belong to the family Moraceae; is a native Ecuadorian plant and it is widely distributed in the territory. This species is used in the shuar traditional medicine as anti-inflammatory and healing. Previous phytochemical research have determined the presence of flavonoids and high antioxidant activity in this plant, being this the reason of this study which objective is the chemical characterization of flavonoids that are found in the rates of 80% in the alcoholic extract of *Ficus citrifolia* found through chromatography techniques: thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD).

Thin-layer chromatography (TLC) showed seven moieties of the sample of *Ficus citrifolia* Mill. that are flavonoids, the values of R_f were calculate for the moieties and standards of flavonoids. Also was shown a great antioxidant capacity for the third and fourth moieties through the autobiography TLC with ethanolic solution 0,5% of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Through HPLC-DAD the values that were obtained retention time (min) and absorption maximum peak (nm) for the moieties of the samples and the standards of flavonoids coincidence were obtained for the first, second and sixth fraction. With the analysis of the results it was identified the presence of rutin (first moiety – R_f 1), hyperoside (second moiety – R_f 2) and luteolin (sixth moiety – R_f 6) in the extract of *Ficus citrifolia* reassuring with it its anti-inflammatory potential.

INTRODUCCIÓN

Ficus citrifolia Mill. conocida como higuierón o mata palo, pertenece al género *Ficus* de la familia Moraceae, es una especie nativa del Ecuador sin embargo en América está distribuida desde Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En el Ecuador es reconocida como una especie maderable, sin embargo en algunas comunidades indígenas de la Amazonía es utilizada como antiinflamatorio, no obstante de acuerdo con investigaciones etnobotánicas en diferentes países, se ha visto que también es utilizada como antibiótico, antihelmíntico, cicatrizante, entre otros usos señalados.

En general las especies del género *Ficus*, en países asiáticos son reconocidas por su amplia actividad farmacológica, varias de estas propiedades han sido comprobadas mediante estudios fitoquímicos y se ha encontrado que están relacionadas con la presencia de metabolitos secundarios, principalmente flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos responsables de las flores y los frutos y se encuentran ampliamente distribuidos en plantas superiores. Estos compuestos químicos tienen su origen a través de la ruta de policétidos y del ácido shikímico. Existen cerca de 10 000 flavonoides los cuales se clasifican de acuerdo a las diferencias de aglicona, fracciones de azúcar, vinculación intersacáridos y posición de glicosilación. En plantas la forma predominante de flavonoides presentes son los glicósidos los cuales exhiben diversas acciones farmacológicas como protector cardiovascular, antibacterial, antiinflamatorios, antialérgicos y efectos antivirales. (Guo *et al.*, 2013).

La capacidad antioxidante de los flavonoides es una de las actividades terapéuticas más reconocidas a nivel farmacológico y está definida por algunos criterios estructurales, como la presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C y grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C. La quercetina es el flavonoide con la función antioxidante más efectiva ya que reúne dichos requisitos estructurales. Además los flavonoides poseen funciones

antioxidantes en las plantas superiores expuestas a estrés ya que reduce la generación de especies reactivas de oxígeno, así como inhibición de peroxidasas.

Debido a la contribución de los flavonoides con efectos beneficiosos para la salud y la prevención de diversas enfermedades, es importante trabajar en la identificación de fuentes de origen natural de dichos compuestos. Por lo que esta investigación presenta la caracterización de los flavonoides presentes en *Ficus citrifolia* Mill. mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD).

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Tema

Caracterización química de los flavonoides presentes en *Ficus citrifolia* Mill.

1.2 Hipótesis

Ficus citrifolia Mill. contiene flavonoides de interés medicinal, por lo que puede considerarse como una fuente natural de antioxidantes.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Realizar la caracterización química de los flavonoides presentes en *Ficus citrifolia* Mill.

1.3.2 Objetivos específicos

- Preparar extractos hidroalcohólicos de hojas de *Ficus citrifolia* Mill. Mill., recolectadas en la zona de Tulipe.
- Separar y caracterizar los flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Ficus citrifolia* Mill., mediante cromatografía de capa fina o TLC, cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC-DAD.

1.4 Justificación

Ficus es el género más numeroso de la familia Moraceae, del cual forman parte cerca de 800 especies (Herbarium Hawaii, 2012), incluyendo epífitas, estranguladores y lianas, y están consideradas dentro de las especies más numerosas en las selvas tropicales en América y África (Stevens, 2001).

Varias de las especies de este género son reconocidas en la medicina tradicional de todo el mundo; emplastos de *F. exasperata* en Nigeria son aplicados como antiinflamatorios (Nworu, Nwuke, Akah, Okoye & Esimone, 2013); en la India *F. religiosa* es usada por sus propiedades cicatrizantes (Gupta & Jain, 2010; Mittal, Sardana & Pandey, 2013) al igual que *F. bengalensis* y *F. deltoide* en la medicina ayurveda (Mittal *et al.*, 2013); *F. insípida* también es empleada en la medicina sidhha, unani y homeópata por su actividad antimicrobiana, cicatrizante, cardioprotector, etc. (Salvi, Joshi, Dhande & Kadam, 2013); por otro lado en la medicina tradicional china son reconocidas *F. hirta* (Yi, *et al.*, 2013) y *F. virens* (Chen, *et al.*, 2013) por sus propiedades antioxidantes; además dentro de este género se encuentra *F. carica* la cual se usa para tratar enfermedades respiratorias, digestivas, diurético, antiinflamatorio, entre otros; en Malasia, India y países del Mediterráneo (Mawa, Husain & Jantan, 2013). En Ecuador se ha generalizado el uso maderable para las especies de Ficus, sin embargo especies como *F. cuatrecasana* Dugand y *F. jacobii* Vázq. Avíla es usado como laxante y cicatrizante; *F. obtusifolia* Kunth y *F. membranacea* C. Wright., es usado como purgante (Aguirre, 2012) y *F. pircriana* Vázq. Avíla y C. C. Berg es utilizado como antihelmíntico (Cerón & Montalvo, 1998).

A partir de la información etnobotánica se han realizado varios estudios fitoquímicos donde se reporta la presencia de flavonoides, los cuales están relacionados con la alta capacidad antioxidante que poseen, dentro de estas especies tenemos: *F. glomerata*, *F. benghalensis* y *F. religiosa* (Anandjiwala, Bagul, Parabia, & Rajani, 2008); *F. virens* (Anandjiwala, *et al.*, 2008; Chen, *et al.*, 2013); *F. lyrata* y *F. platypoda* (El Sayeda, *et al.*, 2013); *F. deltoidea* var. *angustifolia* y var. *kunstleri* (Misbah, Aziz & Aminudin,

2013); y *F. hirta* (Yi, *et al.*, 2013).

En el Ecuador, la especie *Ficus citrifolia* Mill. se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, El Oro, Guayas, Loja, Chimborazo y Manabí (Jørgensen & León-Yáñez, 1999), dentro de comunidades shuar es usada como antiinflamatorio y cicatrizante. Investigaciones preliminares realizadas en la Universidad Politécnica Salesiana arrojan datos importantes para dicha especie con relación a la composición fenólica, presencia flavonoides y actividad antioxidante (Aldana & Guayasamín, 2014).

Debido a que en la actualidad hay un creciente interés por encontrar fuentes naturales de antioxidantes, para introducirlos en nuestra dieta o generar medicamentos de origen natural debido al papel que juegan en la prevención de algunas enfermedades humanas (Chen *et al.*, 2013), la presente investigación pretende continuar con el estudio de *Ficus citrifolia* Mill., centrándose en la caracterización de los flavonoides presentes en dicha especie, mediante técnicas cromatográficas: cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD).

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 *Ficus citrifolia* Mill.

2.1.1 Familia Moraceae

2.1.1.1 Características generales

La familia Moraceae pertenece al orden Rosales y está conformada por árboles, arbustos y rara vez hierbas, sean terrestres o hemiepífitos, dioicos o monoicos además presentan látex.

Sus hojas son simples, enteras y dentadas, generalmente alternas, aunque en ocasiones opuestas; estípulas laterales o libres; pecioladas o sésiles; nervaduras pinnadas a ligeramente palmadas. Presentan flores unisexuales, actinomorfas, sésiles o pediceladas, tépalos libres o connatos; estambres 4; gineceo vestigial presente o ausente, reunidas en inflorescencia axilares, unisexuales o bisexuales, racemosas. Los frutos son drupas o aquenios, con semillas que pueden ser pequeñas con endospermo o grandes sin endospermo y cotiledones iguales o desiguales en tamaño (González & Ibarra, 2012).

A nivel económico, los géneros más importantes en la producción de seda son *Morus* y *Maclura*. Algunas especies de *Broussonetia*, *Maclura* y *Morus* son usadas en la elaboración de papel; y especies de *Artocarpus* y *Broussonetia* se utilizan para fabricación de muebles o madera. (Zhekun & Gilbert, 2003).

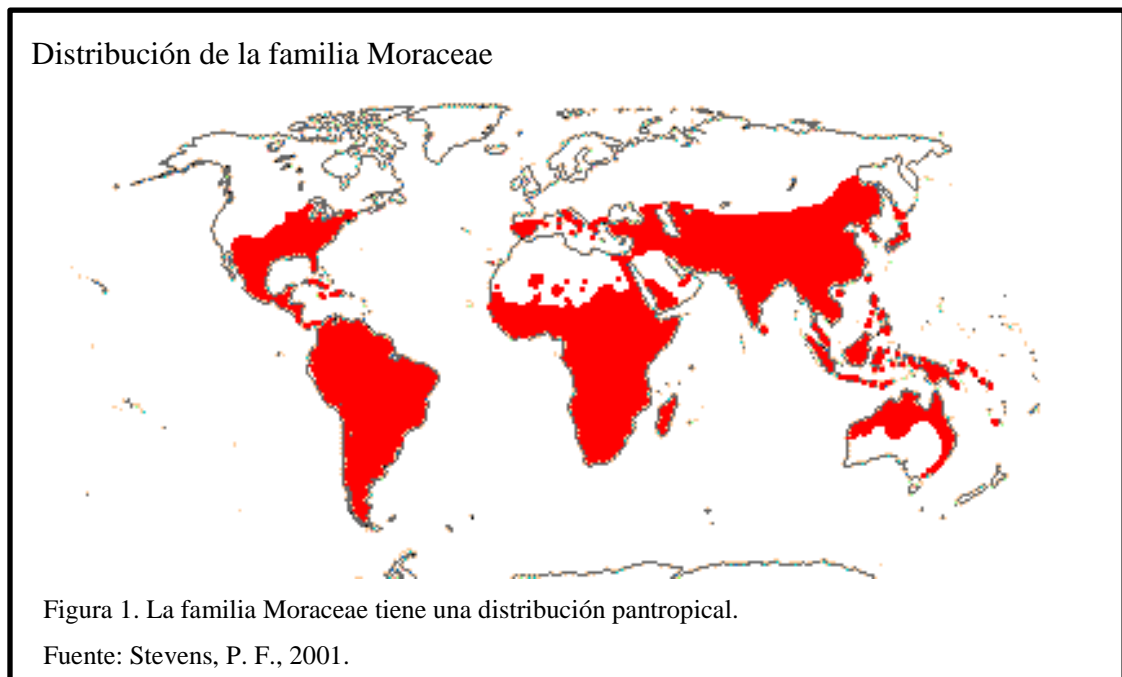
2.1.1.2 Diversidad

Esta familia está conformada por 37 géneros y cerca de 1050 a 1100 especies en todo el mundo, de las cuales 270 especies se encuentran en el trópico de América. Los géneros

más diversos son: *Ficus* con alrededor de 700 a 750 especies, *Dorstenia* con 105 y *Artocarpus* con presencia de 50 a 55 especies (González & Ibarra, 2012).

2.1.1.3 Distribución

Distribución pantropical, con pocos taxones en zonas templadas especialmente del género *Morus*. Las tribus Artocarpeae, Ficeae y Moreae son más diversas en la región de Asia, Australasia, Castilleae y Dornstenieae se encuentran principalmente en el Neotrópico (González & Ibarra, 2012).



2.1.2 Género *Ficus*

2.1.2.1 Características generales

El género *Ficus* incluye árboles rupícolas o terrestres, pudiendo ser epífitas, estranguladores y lianas. (Stevens, 2001).

Las especies de este género son monoicas y presentan raíces aéreas. Las hojas son simples, enteras y con estípulas pareadas, el tronco de corteza lisa o escamosa y con exudado. Se distinguen por sus inflorescencias axilares solitarias o en pares, pedunculadas o sésiles y con infrutescencias en síconos, conocidos como higos. (González & Ibarra, 2012).

El higo o sícono es su estructura diagnóstica, ya que la inflorescencia se asemeja a una urna y en el interior se localizan las flores pistiladas y/o estaminadas, y cuyo único acceso para la polinización es a través del ostíolo, que se trata de una abertura apical (Ibarra, Cornejo, González, Piedra & Luna, 2012).

2.1.2.2 Diversidad

El género *Ficus* está dividido en 6 subgéneros: *Ficus*, *Pharmacosycea*, *Sycidium*, *Sycomorus*, *Synoecia* y *Urostigma* (González & Ibarra, 2012), y se calcula que forman parte cerca de 800 especies (Herbarium Hawaii, 2012).

2.1.2.3 Distribución

Distribución pantropical, con la mayor diversidad en Asia y Australasia (González & Ibarra, 2012). En América se encuentran distribuidos los subgéneros *Pharmacosycea* (Miq.) y *Urostigma* (Gasp.), siendo un aproximado de 140 especies. (González, Cornejo & Ibarra, 2010).

Género Ficus

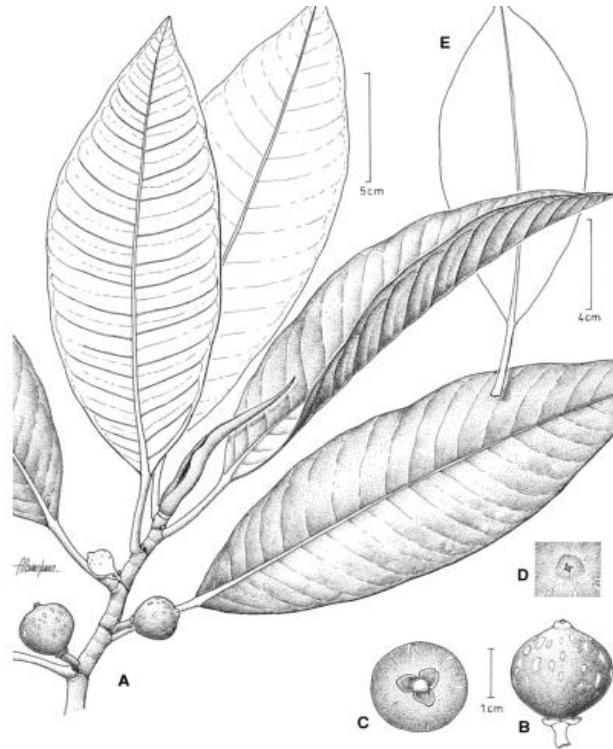


Figura 2. Especie *F. insípida*. (A) Rama con síconos. (B, C, D) Sícono o higo.

Fuente: Ibarra *et al.*, 2012.

2.1.3 *Ficus citrifolia* Mill.

2.1.3.1 Características generales

En México, *Ficus citrifolia* Mill. es conocida como amate, amate prieto, amaiskitle, amezquite, capulincillo y palo liro. Son árboles hemiepífitos, estranguladores o rupícolas, caducifolios o perennifolios, pueden medir de 4 a 15 m de alto, sus tallos son monopódicos, fuste recto a sinuso, corteza parda o pardo grisácea, de copa amplia y redondeada, color verde oscuro. (Durán, Fonseca & Ibarra, 2010).

Son variables en las dimensiones de las hojas, los higos (frutos) y la longitud del pedúnculo. (Berg, 2009). Se caracteriza también por la producción de un exudado grisáceo casi transparente. (González *et al.*, 2010).

Las hojas tienen lámina oblonga, con ambas superficies glabras, base truncada, ápice acuminado y sícono o higo glabro. Síconos obpiriformes (en forma de pera invertida), verdes a rojizos en fresco, con pequeñas máculas pardas, redondeadas, glabros; ostíolo de 1.5 - 4 mm de diámetro. (Durán *et al.*, 2010).

2.1.3.2 Distribución

Ficus citrifolia Mill. se encuentra distribuida desde Estados Unidos (Florida), México, a través de América Central hasta las Guayanas, y Sudamérica desde Colombia hasta el norte de Argentina, especialmente en las tierras bajas húmedas y los bosques montanos en seco a altitudes de hasta 2.200 a 2.400 msnm. (Berg, 2009; Ibarra *et al.*, 2012).

Esta especie es nativa del Ecuador (Jørgensen & León-Yáñez, 1999) y existen varias colecciones botánicas representativas provenientes de diferentes provincias tales como Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos, El Oro, Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Azuay, Loja, Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe. (Berg, 2009).

Ficus citrifolia Mill.

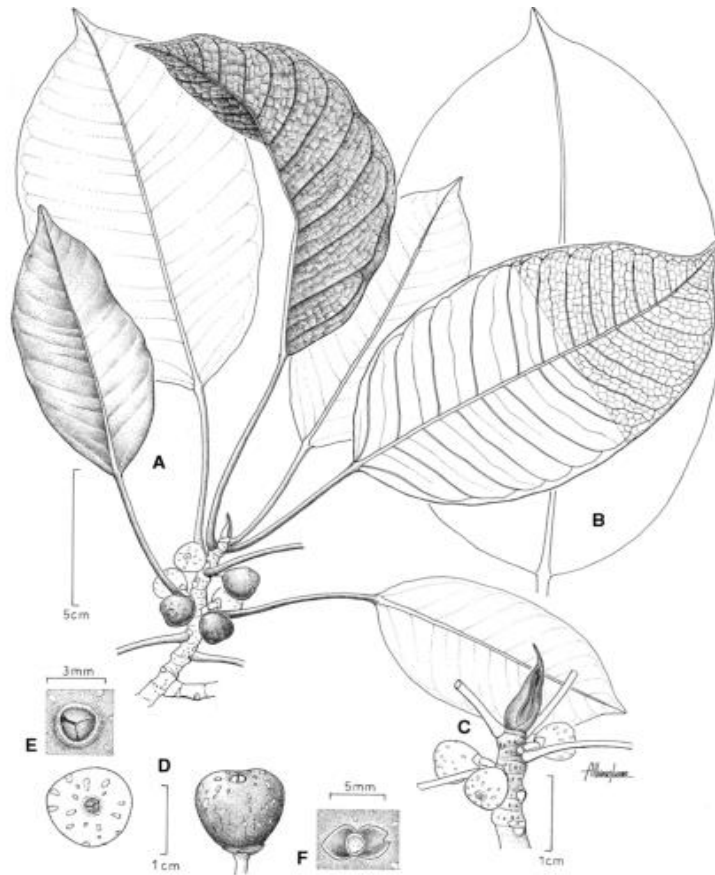


Figura 3. (A) Rama con síconos. (B) Lámina foliar. (C) Yema foliar terminal. (D, E, F) Sícono o higo. Fuente: Ibarra *et al.*, 2012.

Distribución de *Ficus citrifolia* Mill.



Figura 4. Distribución de la especie *Ficus citrifolia* Mill. en Ecuador.
Elaborado por: K. García. Fuente: Berg, 2009.

2.2 Usos

2.2.1 Usos del género *Ficus*

Varias son las especies del género *Ficus* utilizadas en la medicina tradicional en todo el mundo, ya que se han reconocido empíricamente propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, analgésicos, etc. La especie más representativa es *F. carica* L. conocida como higo común, la cual se usa como alimento y en la medicina popular para tratar diversas dolencias gastrointestinales, respiratorias, trastornos cardiovasculares, entre otras. (Mawa *et al.*, 2013).

Son diversas las formas de aplicación y los fines médicos con que estas especies son usadas dentro de cada cultura, así pues, en Nigeria se usan emplastos de *F. exasperata* aplicados con fines antiinflamatorios. (Nworu *et al.*, 2013).

En India *F. religiosa* es usada por sus propiedades cicatrizantes (Gupta & Jain, 2010; Mittal, et al., 2013) al igual que *F. bengalensis* y *F. deltoide* en la medicina ayurveda (Mittal et al., 2013); en la medicina sidhha, unani y homeópata se emplea a *F. insípida* por su actividad antimicrobiana, cicatrizante, cardioprotector, etc. (Salvi et al., 2013).

En Egipto, especies como *F. lyrata*, *F. platypoda* son usadas en la medicina tradicional como antidiabéticos, agentes anticoagulantes, antihelmínticos, así como para tratamientos en enfermedades de la piel (El Sayeda, et al., 2013).

En la medicina tradicional china son reconocidas *F. hirta* (Yi, et al., 2013) y *F. virens* (Chen, et al., 2013) por sus propiedades antioxidantes, *F. pandurata* H. o Xiao xianggou se utiliza como tratamiento de inflamaciones, la gota, artritis e indigestión (Lv et al., 2013).

En Ecuador los usos de las especies de *Ficus* se han generalizado al uso de madera para carpintería, sin embargo, de especies como *F. cuatrecasana* Dugand y *F. jacobii* Vázq. Avíla se utiliza el látex como laxante y cicatrizante de heridas; y en *F. obtusifolia* Kunth y *F. membranácea* C. Wright., es usado como purgante. (Aguirre, 2012). Además el látex de *F. pircrriana* Vázq. Avíla y C. C. Berg, en la Amazonía ecuatoriana también es utilizado para curar diarreas y como antihelmíntico. (Cerón & Montalvo, 1998).

2.2.2 Usos de *Ficus citrifolia* Mill.

Algunos han sido los usos medicinales que se han registrado para *Ficus citrifolia* Mill. a nivel mundial, entre los que podemos citar, se encuentra la aplicación de látex para curar heridas e infecciones (Quattrocchi, 2012), al igual que en ciertos pueblos indígenas de Panamá en donde utilizan la corteza de esta higuera como cicatrizante (Andreu, Friedman, McKenzie, Quintana, & Northrop, 2010).

En las Bahamas se usa para tratar el cáncer, problemas gastrointestinales y circulatorios, así como enfermedades dermatológicas y algunos tipos de dolor (Leon Levy Native

Plant Preserve, 2014). En Costa Rica, se ha empleado en infecciones, en llagas, como masticatorio y vermífugo. (InBio, 2007).

Los habitantes en Santa Lucía usan dos piezas de la raíz con puntas abiertas que unidas se las ponen alrededor de la cintura como un cinturón para tratar dolencias conocidas como mal de la cintura. (Graveson, 2012).

En la provincia de Morona Santiago, la etnia shuar emplea la especie como antiinflamatorio y cicatrizante (Fuente oral). El uso más difundido en Ecuador es el de una especie maderable. (Aldana & Guayasamín, 2014).

2.3 Estudios fitoquímicos

2.3.1 Estudios fitoquímicos del género *Ficus*

De acuerdo a estudios fitoquímicos realizados en especies vegetales se ha determinado que contienen diversos tipos de metabolitos primarios como azúcares y aminoácidos, y metabolitos secundarios como las antocianinas y flavonoides, los cuales están relacionados a diferentes actividades biológicas. (Martínez, 2005).

Sin embargo, los flavonoides son los compuestos más comunes dentro de las especies de este género y se encuentran relacionados con su alta capacidad antioxidante debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de protones o electrones (Aldana, 2007). Así podemos mencionar algunos estudios en donde se ha determinado la presencia de estos compuestos:

- Chen, *et al.* (2013) describe la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides relacionados con el potencial antioxidante en extractos de hojas de *F. virens*.
- El Sayeda, *et al.* (2013) determinó la presencia de carbohidratos, taninos, flavonoides, esteroides y triterpenos en extractos de hojas de *F. lyrata* y *F.*

platypoda.

- *F. deltoidea* var. *angustifolia* y var. *kunstleri*, presentan alto contenido de flavonoides relacionados a sus propiedades antioxidantes, citan la presencia de isovitexina, vitexina, proantocianidinas, monómeros flavan-3-ol y flavonoides glicosidos. (Misbah, *et al.*, 2013).
- *F. hirta* contiene alta concentración de cumarinas (psoraleno y bergapteno), y también flavonoides como luteolina y apigenina. (Yi, *et al.*, 2013).
- Anandjiwala, *et al.* (2008) describe la presencia de compuestos fenólicos y taninos en una formulación ayurvédica llamada Panchvalkalaen, una mezcla de porciones iguales de polvo seco de la corteza del tallo de 5 especies: *F. benghalensis*, *F. glomerata*, *F. religiosa*, *F. virens* y *Thespesia populnea*.
- Lv *et al.*, 2013 en su estudio describe la presencia de luteolina y rutina en *F. pandurata*, la cual contribuye a su uso como antiinflamatorio.

2.3.2 Estudios fitoquímicos en *Ficus citrifolia* Mill.

Investigaciones preliminares realizadas en la Universidad Politécnica Salesiana arrojan datos importantes con relación a la composición fenólica, presencia flavonoides y actividad antioxidante, siendo así que el extracto alcohólico al 80% de hojas de *Ficus citrifolia* Mill. obtuvo un $IC_{50} = 380,366 \mu\text{l/ml}$ en el ensayo de captura de radical DPPH, $IC_{50} = 9,786 \mu\text{l/ml}$ en el ensayo de ABTS, también valores de 22,728 mg GAE/ml en la cuantificación de fenoles totales con el método de Folin- Ciocalteu y finalmente 9,198 mg Hyp/ml en la cuantificación de flavonoides totales. Estos valores, así como la presencia de polifenoles y flavonoides confirman la capacidad antioxidante de esta especie, siendo ligeramente menor a la del té verde en el mismo estudio. (Aldana & Guayasamín, 2014).

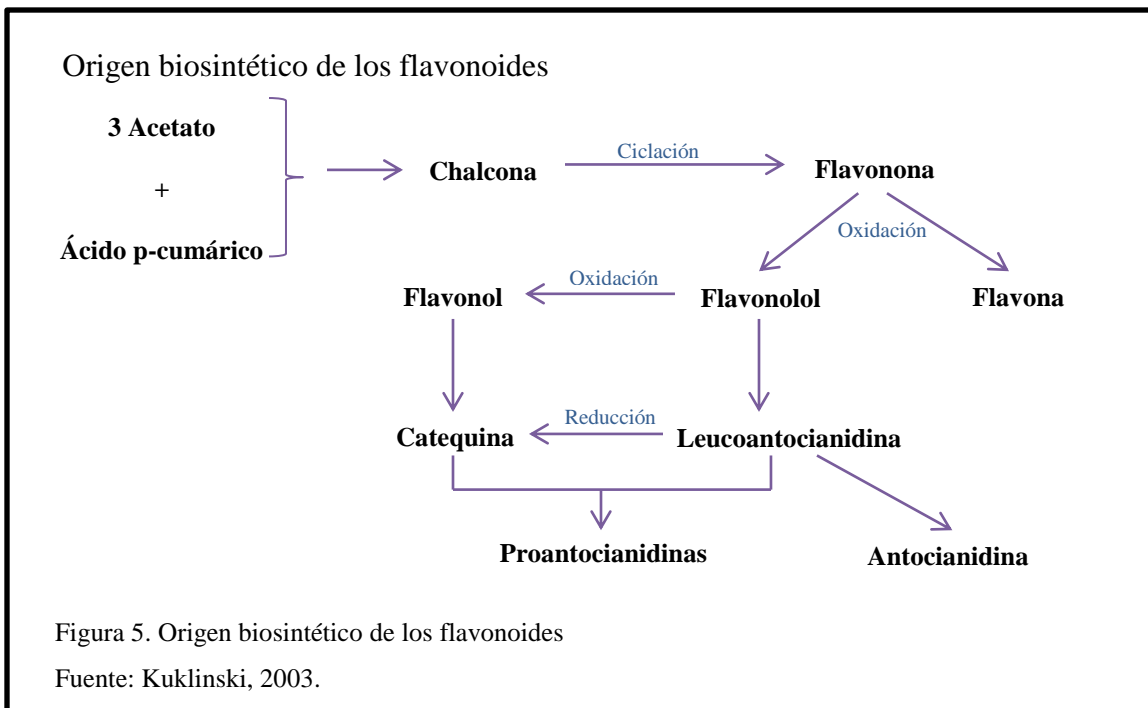
2.4 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios y comprenden cerca de 10 000 estructuras (Agati, Azzarello, Pollastri & Tattini, 2012), se tratan de sólidos cristalinos de color

blanco o amarillento. (Bonkanka, 2006). Considerados pigmentos responsables de la coloración de las flores, frutos y hojas y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores. (Bruneton, 2001).

2.4.1 Origen biosintético

Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de las plantas a través de la ruta de los policétidos que sintetiza el anillo A, y por la ruta del ácido shikímico que sintetiza el anillo B y la unidad C₃ de los flavonoides (Guillermo, 2002; Varas, 2004 y Bonkanka, 2006).



2.4.2 Distribución

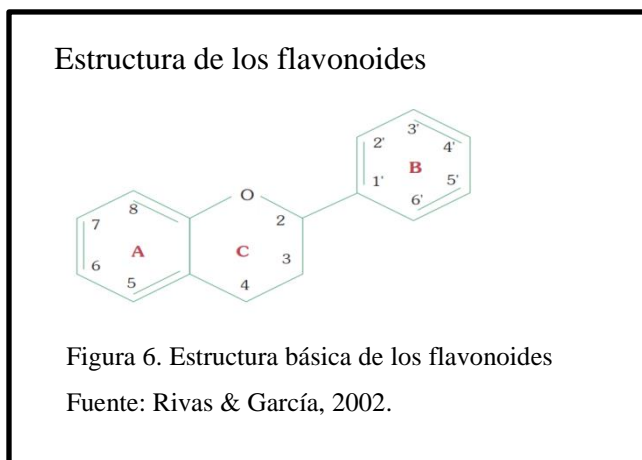
Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente las angiospermas (en hojas, flores y frutos), aunque pocos se han detectado en hongos y algas. (Martínez, 2005). Las principales familias que los contienen son: Rutáceas,

Poligonáceas, Compuestas y Umbelíferas (Kuklinski, 2003).

2.4.3 Localización

Los heterósidos (hidrosolubles) se acumulan en las vacuolas de las células de la epidermis tanto en hojas como en flores. Las agliconas o geninas libres, se encuentran en la cutícula foliar, especialmente en zonas áridas o semiáridas (Bruneton, 2001).

2.4.4 Estructura



Los flavonoides son estructuras del tipo $C_6-C_3-C_6$, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Los grupos de los flavonoides se diferencian por el grado de insaturación y los sustituyentes del anillo C. (Kuklinski, 2003 y Rivas & García, 2002).

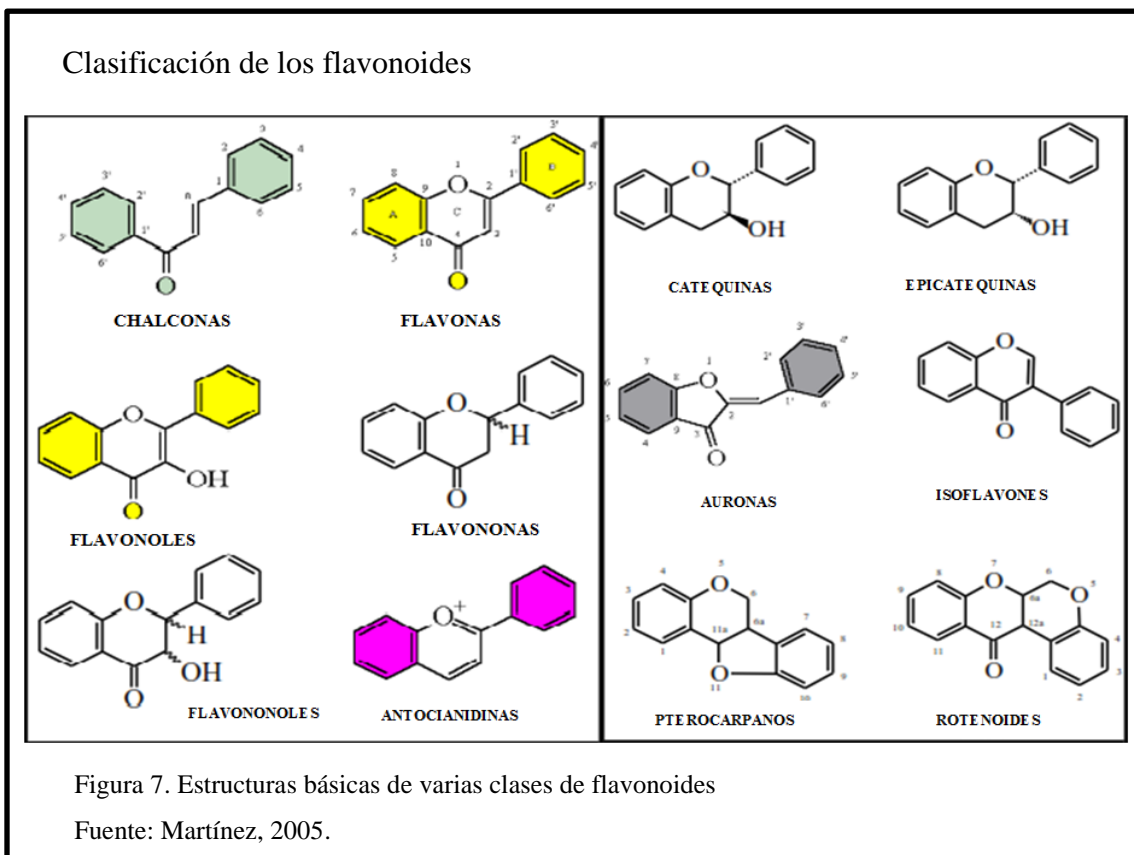
Se pueden encontrar en el caso de los flavonoles y flavonas como O-glicósidos, ya que se unen azúcares (D-glucosa frecuentemente) en la posición C3 o con menor frecuencia al C7 del anillo A; o como aglicones libres o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos. (Kuklinski, 2003; Martínez, González, Culebras & Tuñón, 2002).

2.4.5 Clasificación

Los flavonoides se clasifican de acuerdo a sus variaciones en la estructura, y pueden ser:

- a. Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3.
 - Flavonas: con H en la posición 3.
 - Flavonoles: con OH en la posición 3.
- b. Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3.
 - Flavononas: con H en la posición 3.
 - Flavonololes: con OH en la posición 3.
- c. Chalconas: con el anillo C abierto.
- d. Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3.

También existen dímeros de los flavonoides, llamados diflavonoides. (Kuklinski, 2003).



2.4.6 Propiedades

Solubilidad: depende de la forma en que se encuentren, como aglicones libres son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en disolventes orgánicos, y como heterósidos son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas, e insolubles en disolventes orgánicos apolares. (Kuklinski, 2003).

Agentes quelantes: ciertos grupos funcionales de los flavonoides pueden formar complejos con metales como Fe^{3+} o Al^{3+} . (Kuklinski, 2003).

Oxidación: son sustancias antioxidantes, debido a que se oxidan con mayor rapidez que otro tipo de compuestos. (Kuklinski, 2003).

2.5 Actividad terapéutica de los flavonoides

Las plantas que contienen flavonoides poseen diversas acciones farmacológicas, entre ellas tenemos: antihemorrágicas, antiarrítmicas, antiinflamatorios, antirradicales libres, antihepatotóxicos, antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, diuréticos, antiurémicos, antiespasmódicos, protector de la pared vascular o capilar, entre otras (Kuklinski, 2003). Estas propiedades se atribuyen principalmente a la comprobación de su capacidad antioxidante en estudios *in vitro*, reduciendo la formación de radicales libres e inhibiendo la peroxidación lipídica y la acción de diversas enzimas (Bonkanka, 2006).

Estudios de caracterización química en especies del género *Ficus* describen la presencia de flavonoides como: quercetina, rutina, apigenina, luteolina, psolareno, bergapteno (Nakilcioğlu & Hışıl, 2013; Taskeen, Naeem, Mubeen & Mehmood, 2009 y Yi *et al.*, 2013) asociados a las propiedades terapéuticas antes mencionadas, en la Tabla 1 se presenta un resumen de los efectos farmacológicos en humanos y animales y los compuestos asociados.

Tabla 1.

Actividad farmacológica de los flavonoides

ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	COMPUESTOS	EFECTO FARMACOLÓGICO/ MECANISMO DE ACCIÓN
Protector Vascular	<ul style="list-style-type: none"> - Antocianidina, - Citrina - Rutósido 	<ul style="list-style-type: none"> - Produce disminución de la permeabilidad y aumento de la resistencia de los capilares y vasos sanguíneos llevados a cabo por la citrina y la restauración de parámetros homorreológicos por el O-(β- hidroxietil)-rutósido (Bonkanka, 2006).
Antiagregante plaquetario	<ul style="list-style-type: none"> - Apigenina - Crisina - Floretina 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la ciclooxigenasa y aumento de los niveles de APM cíclico (Bonkanka, 2006).
Antiinflamatorio	<ul style="list-style-type: none"> - Apigenina - Crisina - Gosipina - Hibrifolina - Luteolina - Miricetina - Quercetina - Rutina 	<ul style="list-style-type: none"> - Generado in vitro por su interacción con trombocitos o con el metabolismo del ácido araquidónico (Bonkanka, 2006).
Gastroprotectora	<ul style="list-style-type: none"> - Hipolaetina-8-glucósido - Kaenferol - Quercetina - Rutina - Solona - Naringina 	<ul style="list-style-type: none"> - Mecanismo no prostaglandino-dependiente, por lo cual aumenta el contenido de glicoproteína y la viscosidad de la mucosa gástrica. - Captación de radicales libres - Inhibición de la producción de leucotrienos o del factor activador de plaquetas. - Inhibición del crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>. (Bonkanka, 2006)
Analgésico	<ul style="list-style-type: none"> - Quercetina 	

	<ul style="list-style-type: none"> - Hesperidina - Miricitrina 	
Neuroprotector	<ul style="list-style-type: none"> - Crisina - Apigenina - Cirsiliol 	<ul style="list-style-type: none"> - Se asocia a sus propiedades antioxidantes, captadoras de radicales libres e inhibidores de la peroxidación lipídica y de la xantina oxidasa (Bonkanka, 2006). - Los flavonoides protoantocianídicos pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres, además de ser liposolubles e hidrosolubles, en contraste con otros antioxidantes, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y proteger a las células cerebrales sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres (Martínez et al., 2002).
Antialérgica	<ul style="list-style-type: none"> - Quercetina 	<ul style="list-style-type: none"> - Acción inhibidora sobre el factor de transcripción nuclear kappa B, el cual activa de muchas citosinas proinflamatorias (Bonkanka, 2006). - Inhibición de las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa - Debido a su actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de la matriz (Martínez et al., 2002).
Anticancerígena	<ul style="list-style-type: none"> - Baicaleína - Epigallocatequina - Kaenferol-3-O-β-D-glucopiranosido - Quercetina - Rutina 	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento en las concentraciones intracelulares de glutatión producida por algunos flavonoides (Bonkanka, 2006) - En relación a la prevención del cáncer de mama, podría deberse a su capacidad inhibitoria de la actividad de la aromatasas, que evita de esta forma la conversión de andrógenos en estrógenos (Martínez et al., 2002).
Antidiabética	<ul style="list-style-type: none"> - Isoquercetina - Quercetina 	<ul style="list-style-type: none"> - La inhibición sobre α-glucosidasas intestinales retrasará la digestión y absorción de hidratos de carbono y, en consecuencia suprimir la hiperglucemia (Zhag, Yang, Yingping & Guixing, 2011).

Elaborado por: K. García

2.5.1 Flavonoides como antioxidantes

La actividad antioxidante en los flavonoides se encuentra determinada por cinco características: (1) la presencia de sustituyentes con capacidad donadora de electrones, (2) la capacidad para deslocalizar el radical resultante, (3) potencial de quelación de metales de transición, (4) la accesibilidad del antioxidante al lugar de acción, definido por el carácter lipofílico o hidrofílico y (5) la interacción de los radicales con otras moléculas antioxidantes. (Rivas & García, 2002).

Además se han fijado algunos criterios estructurales necesarios para la eficacia de los flavonoides como antioxidantes (Martínez *et al.*, 2002 y Rivas & García, 2002), y son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

De acuerdo a estos criterios la quercetina reúne los requisitos para ejercer de forma efectiva la función antioxidante. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4,7 mM, es decir, 5 veces mayor al de las vitaminas E y C, además posee una hidrosolubilidad similar a la de la vitamina E. (Martínez *et al.*, 2002).

Tabla 2.

Actividad antioxidante de flavonoides

FLAVONOIDES	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC)
Quercetina	4,7
Epigallocatequina-30-galato	4,8
Epigallocatequina	3,8
Taxifolina	1,9
Catequina	2,4
Luteolina	2,1
Rutina	2,4
Kaempferol	1,3

Nota: Concentración en milimoles (mM) de una solución de Trolox que tiene una capacidad antioxidante igual a una concentración de 1 mM de la sustancia problema. Fuente: Rivas & García, 2002.

2.5.1.1 Actividad antioxidante en plantas

Varias líneas de investigación corroboran la hipótesis de que los flavonoides tienen funciones antioxidantes en las plantas superiores expuestas a estrés, esto debido a que:

- Las polifenol-oxidasas y peroxidasas¹, siempre se producen en plantas superiores.
- Estas plantas acumulan flavonoides dihidroxi B-sustituidos que tienen gran potencial para inhibir y reducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- La biosíntesis de flavonoides antioxidantes aumenta más en especies sensibles al estrés, más no en especies tolerantes al estrés.

(Agati et al., 2012).

Los flavonoides dihidroxi B-sustituidos que se encuentran en el cloroplasto, sugiere un

¹Enzimas dedicadas a la oxidación de polifenoles (Agati *et al.*, 2012).

papel como eliminadores de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), los que están presentes en el núcleo de las células del mesófilo pueden inhibir la generación de ROS y formar complejos con iones de $\text{Fe}^{(2+, 3+)}$ y $\text{Cu}^{(1+, 2+)}$ y finalmente aquellos flavonoides que se encuentran en las vacuolas reducen el escape de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (Agati *et al.*, 2012).

2.6 Técnicas para identificación de flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por la solubilidad frente a solventes polares, su carácter fenólico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro. Existen varias técnicas para la identificación de los flavonoides, entre las que se pueden mencionar las reacciones de coloración y precipitación, cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), espectrofotometría Ultra Violeta (UV), espectrometría de masas, y resonancia magnética nuclear (RMN), entre otros. (Guillermo, 2002).

Las técnicas cromatográficas se entienden como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, la fase estacionaria (inmovilizada en una columna o fijada en un soporte) y la fase móvil, la elución a velocidades diferentes de los compuestos por la fase móvil es la que permite dicha separación. (Rouessac & Rouessac, 2003).

2.6.1 Cromatografía de Capa Fina (TLC)

En la cromatografía de capa fina (TLC) se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. La fase móvil es líquida y asciende por la placa, arrastrando los componentes a lo largo de ésta y produciendo manchas de los compuestos (Rouessac & Rouessac, 2003).

Los eluyentes más comunes usados en TLC son: éter de petróleo, cloruro de metileno,

acetato de etilo, ciclohexano, acetona, tolueno, dietil-éter, entre otros; y el grado de elución de las sustancias depende tanto de su polaridad como de la polaridad del eluyente usado. (Arnao, 2000).

El adsorbente se coloca como una capa delgada adherida a un soporte rígido (generalmente vidrio), algunos contienen indicador de fluorescencia para la identificación más fácil de muestras. (Dolabela, 1997 y Imeh & Khokhar, 2002).

Las manchas incoloras obtenidas en TLC pueden ser reveladas mediante una cámara de luz ultravioleta y una fase estacionaria con un indicador fluorescente para 254 o 366 nm.

2.6.2 Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV-Vis)

En la espectroscopia ultravioleta-visible, los espectros ultravioleta de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoilo), Otros flavonoides como las flavanonas, isoflavonas y flavanoles presentan desplazamientos batocrómicos en la banda II y las auronas, chalconas y antocianidinas también presentan desplazamientos batocrómicos en la banda I. (Martínez, 2005).

Es uno de los métodos más usados para la cuantificación de flavonoides totales en material vegetal crudo debido a su simplicidad, bajo costo de implementación y amplia disponibilidad en laboratorios de control de calidad. (Marques *et al.*, 2013).

2.6.3 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El HPLC es un tipo de cromatografía líquida usada para separar y cuantificar

compuestos de una muestra que está en solución. Dicha solución está en contacto con una segunda fase sea sólida o líquida, y esta interacción ayuda a separar los componentes de la muestra. (Kupiec, 2004).

Es un procedimiento analítico más sensible y selectivo en el área de productos naturales ayuda a cuantificar sustancias aisladas y es ampliamente usado para todas las clases de flavonoides. (Marques *et al.*, 2013).

La instrumentación en HPLC consta de bomba, dispositivo de inyección, columna, detector y visualizador del análisis. El elemento fundamental de este sistema es la columna ya que la separación de los componentes se da de acuerdo a como los analitos y la fase móvil se bombea a través de la columna, y cada componente se visualiza como picos en la pantalla de datos y dicha detección se muestra en un cromatograma, separados en función de sus tiempos de retención. (Kupiec, 2004).

El tiempo de retención se define como el tiempo que se retiene un componente en una columna por la fase estacionaria en relación con el tiempo que reside en la fase móvil. El tipo y composición de la fase móvil afecta a la separación de los componentes, así como la combinación correcta entre la longitud y el material de la fase estacionaria (Kupiec, 2004).

2.6.4 Espectrometría de Masas

Es una técnica analítica ideada para la identificación y cuantificación de compuestos a partir del estudio de su peso molecular. Esta identificación viene del hecho de que después de la interacción de los electrones con una molécula a la que se da un exceso de energía, resulta en la formación de una amplia gama de iones positivos. La distribución de la masa resultante es característica (una huella digital) para esa molécula dada. (Van Galen, 2005).

La espectrometría de masas se basa en el movimiento de una partícula cargada, llamado ión, en un campo eléctrico o magnético. Es posible deducir las estructuras moleculares a partir de la marcación de m/z de los iones más intensos, y mediante la determinación de masas, ya que cada isótopo de cada elemento tiene una masa única. (Plascencia, 2003).

La relación masa-carga (m/z) se utiliza para describir los iones observados en espectrometría de masas. Donde, m es el valor numérico de la masa del ión y z es el valor numérico de la carga del ión. (Van Bramer, 1998).

El espectrómetro de masas consta de las siguientes partes:

- La entrada que transfiere la muestra en el vacío del espectrómetro de masas.
- La región de origen, donde las moléculas neutras de la muestra son ionizados y acelerados en el analizador de masas.
- El analizador de masas, es la parte fundamental del espectrómetro. Aquí se separan los iones, de acuerdo a su relación masa a carga.
- Sistema de datos, el cual detecta la señal de los iones formados y los transfiere para su análisis.
- Sistema de vacío, mantiene la presión baja, además minimiza las reacciones ion-molécula, de dispersión, y la neutralización de los iones.

(Van Bramer, 1998)

La ionización por electrospray acoplado a espectrometría de masas tiene una extensa aplicación en la caracterización estructural de flavonoides glicósidos incluyendo la caracterización de la estructura de la aglicona y la secuencia del glicano. (Guo *et al.*, 2013).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Elaboración de extractos

Se realizó 5 maceraciones con hojas de *Ficus citrifolia* Mill. de concentración 1:10 (alcohólico al 80%), reposaron 14 días a temperatura ambiente. Se filtraron y concentraron hasta alcanzar una concentración de 1g/ml (extracto fluido). (Aldana & Guayasamín, 2014).

3.2 Cromatografía de capa fina (TLC)

Equipos

- Sistema de siembra de muestra (marca: CAMAG, modelo: Linomat 5) con capilar de 20 μ L
- Cámara para cromatografía
- Lámpara de luz UV 254 -366 nm (marca: CAMAG)
- Balanza analítica (marca: 35 Mettler Toledo, modelo: ML204/01),

Materiales

- Placas cromatográficas de silicagel 10x10 cm (marca: MERCK, 20 x 20 cm, sílica gel 60 F₂₅₄).

Reactivos

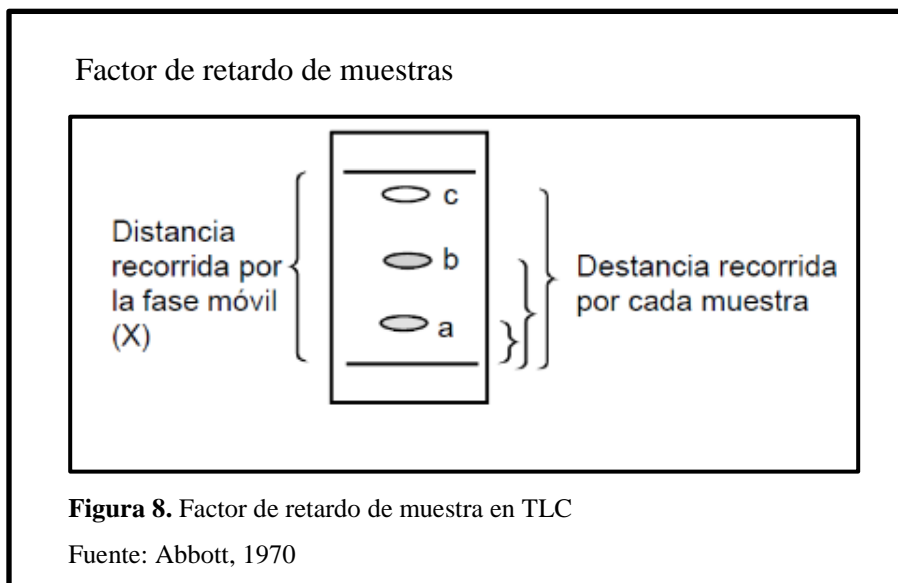
- Fase móvil: Acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, ácido fórmico, agua destilada en proporciones 100:25.10.10.11
- Muestra: 100 μ l de Extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. en 900 μ l de metanol

Procedimiento

- Se tomó 20 μ l de la solución de *Ficus citrifolia* Mill. con el capilar y se colocó en el

cromatógrafo para imprimir dos muestras en la placa de sílicagel.

- Se colocó 50 ml de fase móvil en la cámara para cromatografía y posteriormente se introduce la placa de sílicagel con las muestras (fase estacionaria) y se deja reposar en la sorbona hasta que el solvente alcance 1 cm antes del final de la placa cromatográfica. Se retira la placa de la cámara para cromatografía y se deja secar completamente.
- La placa de sílicagel se llevó a la lámpara de luz UV para observar la separación de la muestra e identificar las fracciones, mediante el cálculo de Rfs (Figura 8 y Ecuación 1).



Ecuación 1. Factor de retardo de muestras

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

Fuente: Abbott, 1970

3.3 TLC autobiográfica con solución de 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH)

Equipos

- Sistema de siembra de muestra (marca: CAMAG, modelo: Linomat 5) con capilar de 20 μ L.
- Cámara para cromatografía
- Lámpara de luz UV 254 -366 nm (marca: CAMAG)
- Nebulizador
- Bomba de aire (marca: GAST, modelo: DOA-P704-AA)
- Balanza analítica (marca: 35Mettler Toledo, modelo: ML204/01)

Materiales

- Placas cromatográficas de silicagel 10x10 cm (marca: MERCK, 20 x 20 cm, sílica gel 60 F₂₅₄).

Reactivos

- Fase móvil: Acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, ácido fórmico, agua destilada en proporciones 100:25.10.10.11
- Muestra: 100 μ l de Extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. en 900 μ l de metanol
- Solución de DPPH: 0,5% DPPH en etanol al 96%

Procedimiento

- A la placa de TLC se nebulizó un lado una de las impresiones de *Ficus citrifolia* Mill. con la solución de DPPH e identificamos las fracciones que se tornen transparentes.

3.4 Identificación de flavonoides mediante TLC

Equipos

- Sistema de siembra de muestra (marca: CAMAG, modelo: Linomat 5) con capilar de 20 μ L
- Cámara para cromatografía
- Lámpara de luz UV 254 -366 nm (marca: CAMAG)
- Balanza analítica (marca: 35Mettler Toledo, modelo: ML204/01)
- Sorbona

Materiales

- Placas cromatográficas de silicagel 10x10 cm (marca: MERCK, 20 x 20 cm, sílica gel 60 F₂₅₄)

Reactivos

- Fase móvil: Acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, ácido fórmico, agua destilada en proporciones 100:25.10.10.11.
- Muestra: 100 μ l de Extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. en 900 μ l de metanol
- Solución de estándares: 1g de estándar de flavonoide en 1 ml de metanol (para cada estándar que se especifica a continuación)
- Estándares de flavonoides: naringina, hesperidina, diosmina, catequina, quercetina, miricetina, daidzaina, kanferol, apigenina, morina, hidroxiflavona, baicaleina, luteolina, naringenina, genisteina, hiperoside, crisina, equigalocatequina, silibina y rutina.

Procedimiento

- Se realizaron tres placas de sílicagel, las que se sembró una muestra de 20 μ l de la solución del extracto de *Ficus citrifolia* Mill. y 20 μ l de siete estándares de flavonoides diferentes, en cada placa.
- Una vez listas las placas, se colocaron en la cámara para cromatografía con la fase

móvil antes descrita, se dejaron reposar en la sorbona hasta que el solvente alcance 1 cm antes del final de la placa cromatográfica. Las placas fueron retiradas y secadas completamente.

- Finalmente las placas se llevaron a la lámpara de luz UV para observar la separación de la muestra, identificar las fracciones y la posición de cada estándar en la placa, posteriormente se realiza el cálculo de R_fs.

3.5 Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)

Equipos

- HPLC – DAD (marca: Varian modelo ProStar 320)
- Columna C18 (marca Varian de 150 x 4,6 mm, con un diámetro de partícula de 5 um)
- Sistema de siembra de muestra (marca: CAMAG, modelo: Linomat 5) con capilar de 20 µL
- Cámara para cromatografía
- Lámpara de luz UV 254 -366 nm (marca: CAMAG)
- Bomba de aire (marca: GAST, modelo: DOA-P704-AA)
- Ultrasonido (marca: Branson, modelo: 1510R-MTH)
- Vórtex (marca: VORTEX MIXER, modelo: VM-300)
- Centrifuga (marca: SELECTA, modelo: Fuse (A):3)
- Equipo de filtración al vacío

Materiales

- Placas preparativas de silicagel 10x10 cm (marca: MERCK, 20 x 20 cm, sílica gel 60 F₂₅₄)
- Membranas pdvf

Reactivos

- Fase móvil para TLC: Acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, ácido fórmico,

agua destilada en proporciones 100:25.10.10.11.

- Muestra: 100 µl de Extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. en 900 µl de metanol
- Solución de estándares: 1g de estándar de flavonoide en 1 ml de metanol (para cada estándar que se especifica a continuación)
- Estándares de flavonoides: naringina, hesperidina, diosmina, catequina, quercetina, miricetina, daidzaina, kanferol, apigenina, morina, hidroxiflavona, baicaleina, luteolina, naringenina, genisteina, hiperoside, crisina, equigalocatequina, silibina y rutina.

Procedimiento

- Se realizó una placa preparativa de sílicagel para TLC con siete siembras de 95 µl de solución del extracto de *Ficus citrifolia* Mill. y se realizó el procedimiento para TLC.
- Una vez identificadas las fracciones se realizó un raspado de cada fracción, colocando a cada fracción en un tubo de ensayo diferente para centrífuga, se añadió 4 ml de metanol, se colocó en el vórtex cada tubo de ensayo durante un minuto, luego se los llevó al ultrasonido durante 5 min, y finalmente se centrifugaron por 5 min.
- Una vez que se ha separado completamente el metanol de la silicagel, se extrajo el líquido y se filtró con membranas pdvf y se colocaron en tubos de 2 ml para HPLC, así como la solución metanólica de los estándares de flavonoides mencionados anteriormente.
- Para el análisis en el HPLC-DAD, se empleó la fase móvil A constituida de agua y ácido fórmico (95:5) y la fase móvil B de metanol (100).
- La gradiente de flujo de solvente fue: 0-25 minutos: 35% B y 65% A, 25-35 minutos: 50% B y 50% A, 35-40 minutos: 80% B y 20% A, 40-45 minutos: 90% B y 10% A, 50 minutos: 35% B y 65% A. La longitud de onda del análisis es de 340 nm.²

²Metodología para HPLC del Laboratorio de Biología y Evolución de la Universidad de Ferrara

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Elaboración de extractos

Las placas cromatográficas se realizaron a partir del extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. puesto que en estudios anteriores demostró que posee mayor cantidad de flavonoides y actividad antioxidante (Aldana & Guayasamín, 2014).

4.2 Cromatografía de capa fina (TLC)

La separación cromatográfica del extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill., observado en la cámara de luz UV a 366 nm - 245 nm, indica la presencia de siete flavonoides (Figura 9). En la Tabla 3 se incluyen los valores de Rf para cada fracción así como las fluorescencias a 366 nm y 245 nm.

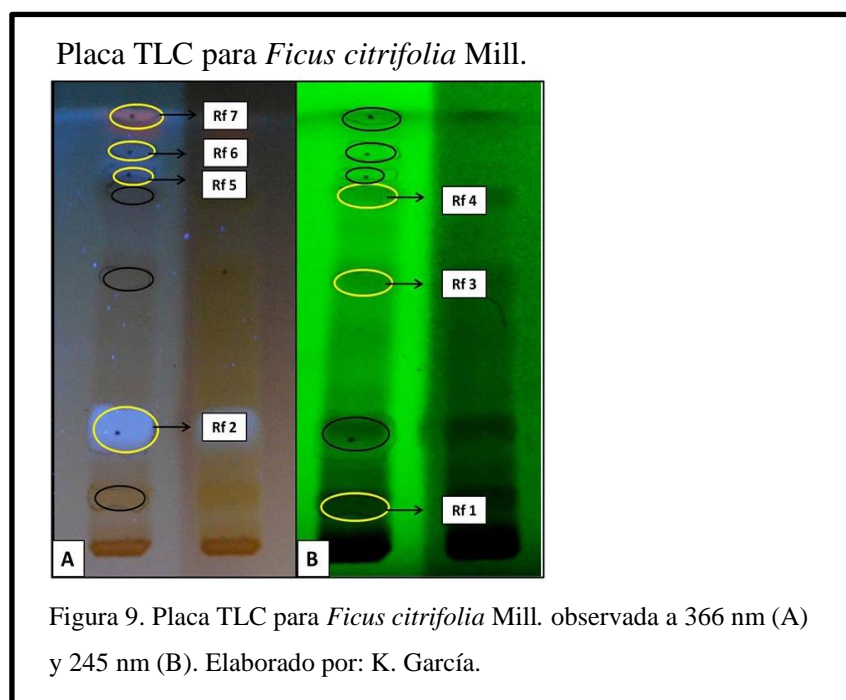


Tabla 3.

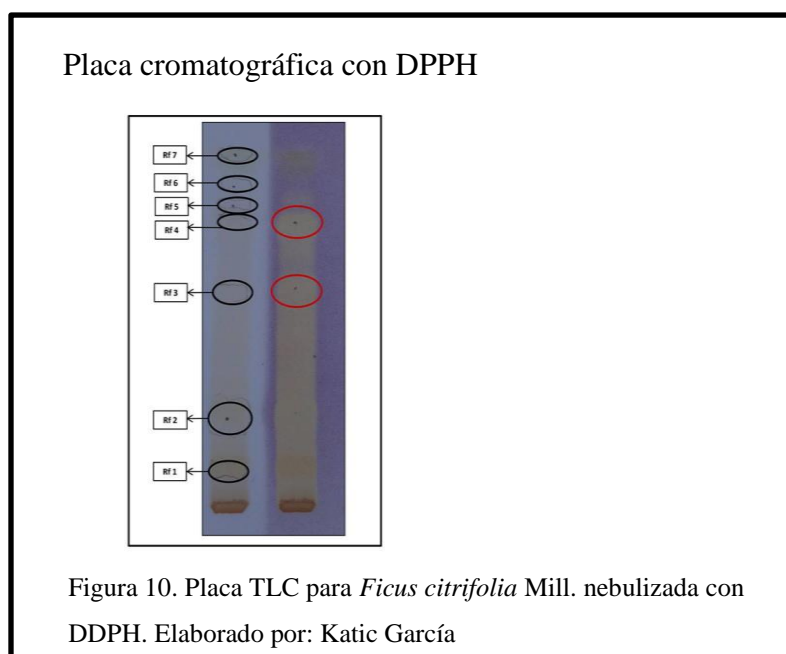
Valores de Rf de las fracciones de *Ficus citrifolia* Mill.

Fracción	Rf	UV 366 nm	UV 245 nm
Rf 1	0,10	-	Plomo
Rf 2	0,22	Fluorescencia azul	-
Rf 3	0,51	-	Plomo
Rf 4	0,69	-	Plomo
Rf 5	0,74	Fluorescencia azul	-
Rf 6	0,78	Fluorescencia azul	-
Rf 7	0,86	Fluorescencia roja	-

Nota: K. García

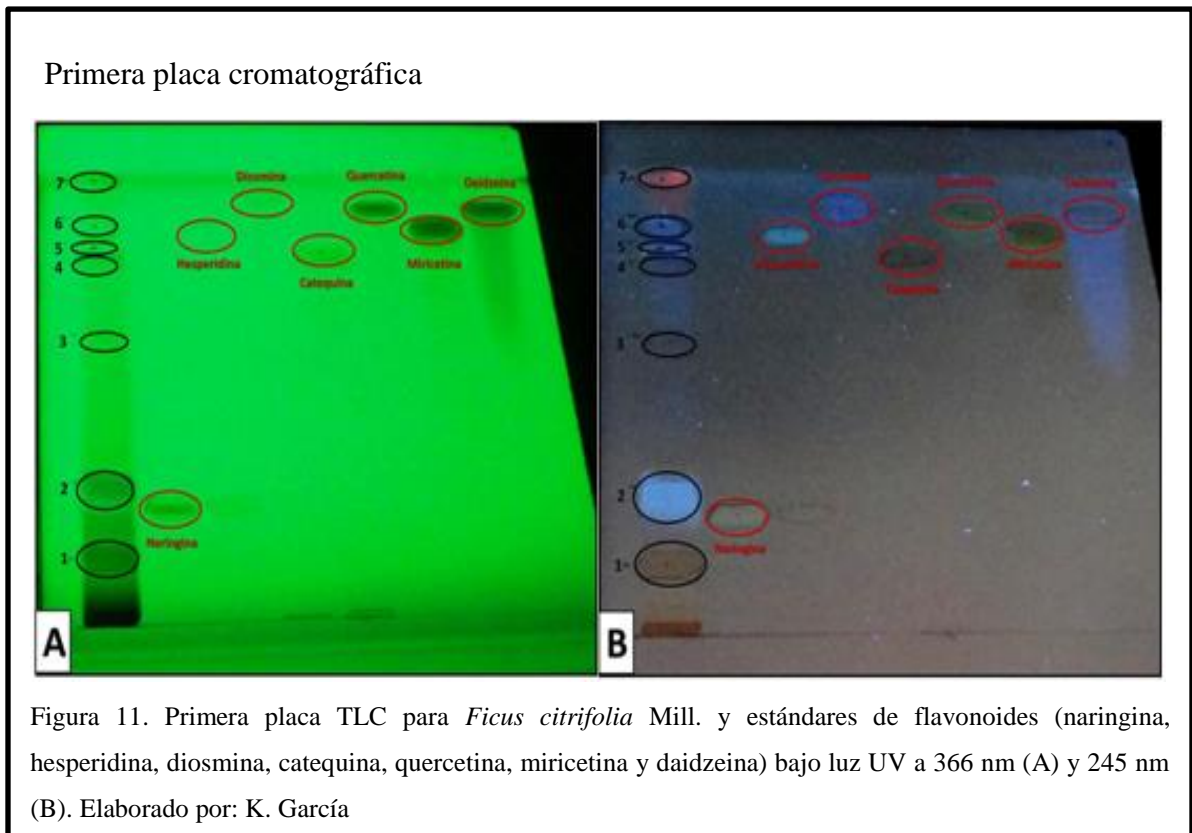
4.3 TLC autobiográfica con DPPH

Mediante la prueba de DPPH, se puede aproximar de acuerdo a la coloración, las fracciones con mayor capacidad antioxidante, la Figura 10 muestra que las fracciones Rf 3 y Rf 4 son las que presentan mayor actividad antioxidante.



4.4 Identificación de flavonoides mediante TLC

A continuación se observan las placas cromatográficas del extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill. con los estándares de flavonoides, la primera placa para naringina, hesperidina, diosmina, catequina, quercetina, miricetina y daidzeina (Figura 11), la segunda placa con los estándares kanferol, apigenina, morina, hidroxiflavona, baicaleina, luteolina, y naringeninga (Figura 12) y la tercera placa con genisteina, hiperósido, crisina, epigallocatequina, silibina y rutina (Figura 13).



Segunda placa cromatográfica

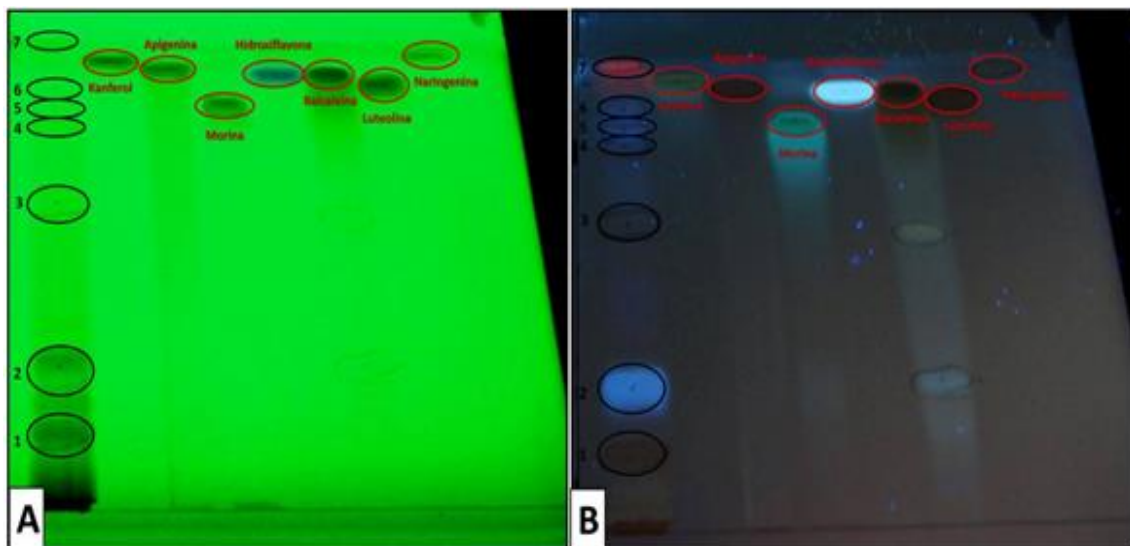


Figura 12. Segunda placa TLC para *Ficus citrifolia* Mill. y estándares de flavonoides (kanferol, apigenina, morina, hidroxiflavona, baicaleina, luteolina, y naringenina) bajo luz UV a 366 nm (A) y 245 nm (B).
Elaborado por: Katic García

Tercera placa cromatográfica

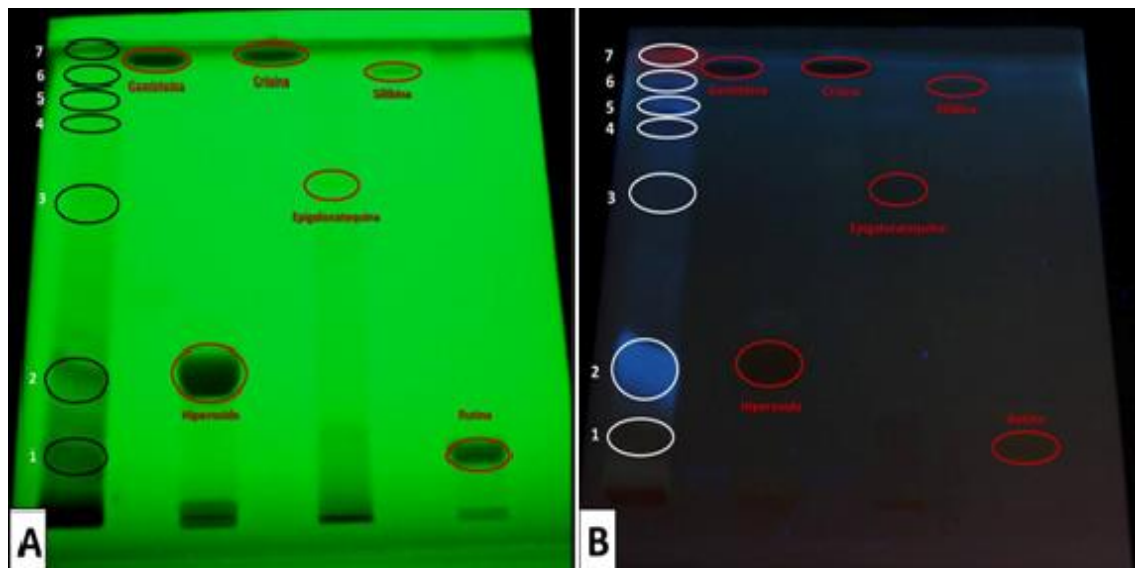


Figura 13. Tercera placa TLC para *Ficus citrifolia* Mill. y estándares de flavonoides (genisteina, hiperósido, crisina, epigallocatequina, silibina y rutina) bajo luz UV a 366 nm (A) y 245 nm (B). Elaborado por: K. García

Cada placa fue observada en la cámara de luz UV a 366 nm y 245 nm, para identificar la posición de los flavonoides respecto a la muestra de *Ficus citrifolia* Mill., además se identifica la presencia o no de fluorescencia así como su color. En las tablas 4, 5 y 6 se indican los datos de Rf y fluorescencia para las fracciones de *Ficus citrifolia* Mill. y los estándares de flavonoides.

Tabla 4.

Primera placa TLC

Fracción	Rf	UV 366 nm	UV 245 nm
Rf 1	0,13	-	Plomo
Rf 2	0,25	Fluorescencia azul	-
Rf 3	0,57	-	Plomo
Rf 4	0,75	-	Plomo
Rf 5	0,78	Fluorescencia azul	-
Rf 6	0,82	Fluorescencia azul	-
Rf 7	0,95	Fluorescencia roja	-
Naringina	0,22	Fluorescencia blanquecina	-
Hesperidina	0,81	Fluorescencia celeste	-
Diosmina	0,88	Fluorescencia azul	-
Catequina	0,76	Fluorescencia rojiza	-
Quercetina	0,87	Fluorescencia verdosa	Plomo
Miricetina	0,82	Fluorescencia naranja	Plomo
Daidzeina	0,87	Fluorescencia azul	Plomo

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ficus citrifolia* Mill. y estándares de flavonoides.

Elaborado por: K. García.

Tabla 5.

Segunda placa TLC

Fracción	Rf	UV 366 nm	UV 245 nm
Rf 1	0,13	-	Plomo
Rf 2	0,26	Fluorescencia azul	-
Rf 3	0,58	-	Plomo
Rf 4	0,75	-	Plomo
Rf 5	0,78	Fluorescencia azul	-
Rf 6	0,83	Fluorescencia azul	-
Rf 7	0,94	Fluorescencia roja	-
Kanferol	0,90	Fluorescencia naranja	Plomo
Apigenina	0,89	Fluorescencia rojiza	Plomo
Morina	0,80	Fluorescencia turquesa	Plomo
Hidroxiflavona	0,88	Fluorescencia blanca	Azul
Baicaleina	0,87	Fluorescencia café	Plomo
Luteolina	0,84	Fluorescencia rojiza	Plomo
Naringenina	0,93	Fluorescencia rojiza	-

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ficus citrifolia* Mill. y estándares de flavonoides.

Elaborado por: K. García

Tabla 6.

Tercera placa TLC

Fracción	Rf	UV 366 nm	UV 245 nm
Rf 1	0,11	-	Plomo
Rf 2	0,28	Fluorescencia azul	-
Rf 3	0,61	-	Plomo
Rf 4	0,78	-	Plomo
Rf 5	0,83	Fluorescencia azul	-
Rf 6	0,89	Fluorescencia azul	-
Rf 7	0,95	Fluorescencia roja	-
Genisteina	0,92	-	Plomo
Hiperósido	0,26	-	Plomo
Crisina	0,94	-	Plomo
Epigallocatequina	0,64	-	-
Silibina	0,88	-	-
Rutina	0,11	Fluorescencia rojiza	Plomo

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ficus citrifolia* Mill. y estándares de flavonoides.

Elaborado por: K. García

4.5 Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)

Mediante la placa preparativa de TLC se obtuvieron seis fracciones del extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill., los cuales fueron analizados mediante HPLC-DAD junto a los estándares de flavonoides (naringina, hesperidina, diosmina, catequina, quercetina, miricetina, daidzeina, kanferol, apigenina, morina, hidroxiflavona, baicaleina, luteolina, naringeninga, genisteina, hiperósido, crisina, epigallocatequina, silibina y rutina), se realizó un análisis del tiempo de retención y los picos máximos de absorción para cada compuesto (Tabla 7).

Tabla 7.

Tiempos de retención y picos máximos de absorción

Nº	Compuesto	R _t (min)	I _{max} (nm)		
Fracción 1	Rf 1	4,49	205	258	353
Fracción 2	Rf 2	4,58	209	260	357
Fracción 3	Rf 3	4,603	201	275,5	
Fracción 4	Rf 4	4,629	207		
Fracción 5	Rf 5	-	-	-	-
Fracción 6	Rf 6	10,314	263		
Estándar 1	Luteolina	10,282	270		
Estándar 2	Miricetina	4,543	247	348	
Estándar 3	Kanferol	4,946	230	265	354
Estándar 4	Hiperósido	4,424	213	256	356
Estándar 5	Morina	5,151	207	253	355
Estándar 6	Naringina	4,232	227	284	326
Estándar 7	Silibina	4,398	284		
Estándar 8	Hidroxiflavona	5,521	237	255	356
Estándar 9	Rutina	4,339	216	255	357
Estándar 10	Baicaleina	6,926	214	274	322
Estándar 11	Quercetina	6,63	203	254	263,5
Estándar 12	Crisina	4,982	208	275	325
Estándar 13	Diosmina	5,01	201	274	
Estándar 14	Daidzeina	4,666	220	239	
Estándar 15	Epigallocatequina	4,099	223		
Estándar 16	Genisteina	4,751	234	249	
Estándar 17	Apigenina	5,976	209	267	334
Estándar 18	Hesperidina	4,286	209	283	327
Estándar 19	Naringenina	4,714	234	277	
Estándar 20	Catequina	4,238	223	276	

Nota: Valores del tiempo de retención y I_{max} para fracciones de *Ficus citrifolia* Mill. y estándares de flavonoides. Elaborado por: K. García

4.6 Identificación de flavonoides en *Ficus citrifolia* Mill.

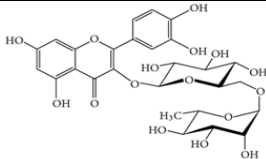
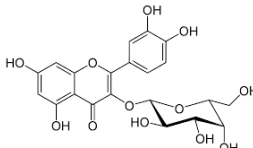
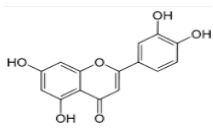
Para la identificación final de los flavonoides se realizó una comparación entre los datos obtenidos en TLC (valor de Rf y la fluorescencia de los compuestos) y datos de HPLC-DAD (tiempo de retención y picos de absorción máxima de cada compuesto), obteniendo los siguientes resultados (Tabla 8):

- La primera fracción (Rf 1) de *Ficus citrifolia* Mill. obtuvo un valor de Rf = 0,11; R_t = 4,49 min y I_{mas} = 205, 258 y 353 nm. Obteniendo una coincidencia con la Rutina cuyo valor de Rf = 0,11; R_t = 4,339 min y I_{mas} = 216, 255 y 357 nm.
- La segunda fracción (Rf 2) de *Ficus citrifolia* Mill. obtuvo un valor de Rf = 0,28; R_t = 4,58 min y I_{mas} = 209, 260 y 356 nm. Obteniendo una coincidencia con el Hiperósido cuyo valor de Rf = 0,26; R_t = 4,424 min y I_{mas} = 213, 256 y 356 nm
- La tercera (Rf 3) y cuarta fracción (Rf 4) de *Ficus citrifolia* Mill. no obtuvieron coincidencias en los valores de factor de retardo de la muestra (Rf), tiempo de retención (R_t) y picos máximos de absorción (I_{máx}) con los estándares de flavonoides.
- La quinta fracción (Rf 5) de *Ficus citrifolia* Mill. no exhibió la presencia de flavonoides en los cromatogramas de HPLC-DAD.
- La sexta fracción (Rf 6) de *Ficus citrifolia* Mill. obtuvo un valor de Rf = 0,83; R_t = 10,314 min y I_{mas} = 263 nm. Obteniendo una coincidencia con la Luteolina cuyo valor de Rf = 0,84; R_t = 10,282 min y I_{mas} = 270 nm.

En algunos casos las fluorescencias de las fracciones no coincidieron con las emitidas por los estándares de flavonoides a luz UV de 266 y 245 nm, lo cual indica una posible contaminación, sin embargo al coincidir en valores de Rf, R_y y I_{máz} se acepta la identidad del flavonoide.

Tabla 8.

Identificación de flavonoides en *Ficus citrifolia* Mill.

Fracción	Nombre	Estructura	Rt (min)	Lmáx (nm)
Rf 1	Rutina		4,49	205,258,353
Rf 2	Hiperósido		4,58	209,260,357
Rf 3	no identificada	-	4,603	201,275
Rf 4	no identificada	-	4,629	207
Rf 5	-	-	-	-
Rf 6	Luteolina		10,314	263

Nota: Flavonoides indentificados en *Ficus citrifolia* Mill. Elaborado por K. García.

La rutina debido a que incrementa la actividad de la enzima glutatión peroxidasa previene la peroxidación lipídica, ejerciendo efectos antiulcerosos, además inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad por lo que tienen rol importante en la prevención de la aterosclerosis. Sin embargo, debido a su estado glicosilado es hidrofílica por lo que es menos accesible a la membrana lo que influye en una menor efectividad en la prevención del daño oxidativo (Ojeda, 2013; Sánchez, 2009 y Varas, 2004).

Por otro lado la luteolina es una flavona con actividad estrogénica potente a bajas concentraciones, ya que se pueden unir a receptores estrogénicos (ERs) y activar sus

vías de señalización, también se ha descrito que ejerce efectos antiinflamatorios por la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias (Ojeda, 2013).

En diversos estudios fitoquímicos se evidencia la relación entre los usos medicinales tradicionales de diferentes especies y la composición química de la misma, así tenemos que *Dracocephalum kotschyi* (Lamiaceae) procedente de Irán presenta actividades farmacológicas como antihiperlipidémico, inmuno-modulador, citotóxico, e inhibidor selectivo de tumores (actividad anticancerígena), esta especie contiene flavonoides como luteolina, calicopterina, isokaempferidina, apigenina, etc (Fattahi et al., 2013).

Así mismo *Ficus sarmentosa* var. *henryi* King posee actividad inhibitoria para hongos patógenos, y en cuya composición química la luteolina es quien posee mayor capacidad antifúngica (Wang, Wie, Tian, Shen & Xu, 2010).

Varas (2004) en su estudio de plantas medicinales del Sur de Chile, reporta la presencia de ciertos flavonoides y su relación con el las actividades terapéuticas de las plantas, es así que la presencia de rutina en *Peumus boldus* (boldo), *Foeniculum vulgare* (hinojo) *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Ruta graveolens* (ruda) confirma la actividad antiinflamatoria, hepatotóxica, cardioprotectora.

Mientras que presencia de luteolina en *Buddleja globosa* (matico) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto), la relaciona con la actividad gastroprotectora y antiinflamatoria.

Es así que el uso medicinal tradicional de *Ficus citrifolia* Mill. para curar heridas e infecciones (InBio, 2007 y Quattrocchi, 2012), como cicatrizante (Andreu et al., 2010), anticancerígeno, tratamiento contra problemas gastrointestinales y circulatorios, enfermedades dermatológicas y algunos tipos de dolor (Leon Levy Native Plant Preserve, 2014) en diversos países; y como antiinflamatorio y cicatrizante usado por el pueblo shuar en Ecuador, se encuentra asociado a la presencia de rutina, hiperósido y luteolina de acuerdo con la caracterización química realizada en esta investigación.

CONCLUSIONES

- Mediante cromatografía de capa fina (TLC) se determinó la presencia de siete flavonoides en el extracto alcohólico al 80% de *Ficus citrifolia* Mill.
- El análisis con DPPH permitió identificar en la muestra de *Ficus citrifolia* Mill la presencia de dos flavonoides con capacidad antioxidante alta siendo estas, la tercera y cuarta fracción, las cuales no pudieron ser caracterizadas mediante las técnicas fitoquímicas utilizadas en la presente investigación.
- La combinación de la cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC-DAD) da como resultado la identificación positiva de tres moléculas de naturaleza flavonóica debido a la coincidencia de valores (R_f , R_t y λ_{mas}) vista en las técnicas en conjunto.
- La primera fracción (R_f 1) de *Ficus citrifolia* Mill. fue identificada como rutina ya que obtuvo un valor de $R_f = 0,11$; $R_t = 4,49$ min y $\lambda_{mas} = 205, 258$ y 353 nm, semejante a los datos del estándar.
- La segunda fracción (R_f 2) de *Ficus citrifolia* Mill. obtuvo un valor de $R_f = 0,28$; $R_t = 4,58$ min y $\lambda_{mas} = 209, 260$ y 356 nm, dando la identidad de Hiperósido.
- La sexta fracción (R_f 6) de *Ficus citrifolia* Mill. ha sido caracterizada como la luteolina por su valor de $R_f = 0,83$; $R_t = 10,314$ min y $\lambda_{mas} = 263$ nm, similar al estándar de dicho flavonoide.
- Se observa que la luteolina y rutina de acuerdo a su actividad biológica y mecanismos de acción tienen propiedades antiinflamatorias, lo que comprueba el uso tradicional de *Ficus citrifolia* Mill. en comunidades shuar como antiinflamatorio y cicatrizante.

RECOMENDACIONES

- La presencia de flavonoides con actividades farmacológicas relevantes en *Ficus citrifolia* Mill. indica el potencial de esta especie como fuente natural de antioxidantes, la cual podría ser utilizada ampliamente con fines terapéuticos.
- Es necesaria la investigación en las fracciones de la muestra de *Ficus citrifolia* Mill. que no fueron caracterizadas en este trabajo con el fin relacionar su presencia con la alta capacidad antioxidante revelada en la placa autobiográfica de TLC. Actualmente las 6 fracciones aisladas del extracto alcohólico de *Ficus citrifolia* Mill. se hallan en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Pavia para ser analizadas por la metodología ESI-MS y de esta manera obtener mayor información de su naturaleza química.
- Si bien el presente estudio ha realizado una caracterización inicial de los flavonoides presentes en *Ficus citrifolia* Mill., se recomienda continuar con estudios de cuantificación de compuestos flavonóicos y la comprobación de las actividades terapéuticas en dicha especie.
- De acuerdo a las referencias revisadas en este estudio se ha observado la falta de investigaciones en cuanto a la distribución geográfica e información etnobotánica y de botánica económica para *Ficus citrifolia* Mill. en el Ecuador, por lo que se recomienda realizar este tipo de estudios con el finde ampliar la información que se tiene hasta el momento de esta especie.
- Para la identificación de flavonoides en plantas se recomienda utilizar métodos de análisis químicos más específicos y complejos como espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abbott, D. (1970). Introducción a la Cromatografía. Brooks/Cole, 34 (3), 5-14
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76
- Aguirre, Z. (2012). Especies forestales de los bosques secos del Ecuador, Guía dendrológica para su identificación y caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el cambio Climático. MAE/FAO – Finlandia. Quito, Ecuador. 40 – 48. Recuperado en 19 de abril de 2014, de: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/Bosques-Secos4.pdf>
- Aldana, D. (2007). Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger: tres especies de calahuala nativas de Guatemala. Tesis para optar al título de Maestría multidisciplinaria en productos y uso de plantas medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Estudios de Postgrados. Guatemala.
- Aldana, C. & Guayasamín, L. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Ficus citrifolia* y caracterización química de los polifenoles. Tesis para optar al título de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
- Anandjiwala, S., Bagul, M. S., Parabia, M. & Rajani, M. (2008). Evaluation of free radical scavenging activity of an ayurvedic formulation, Panchvalkala. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 70(1), 31.

- Andreu, M., Friedman, M., McKenzie, M., Quintana, H. & Northrop, R. (2010). *Ficus citrifolia*, Shortleaf Fig. Recuperado en 19 de abril de 2014, de: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FR/FR32800.pdf>
- Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, *11*(2), 419-420.
- Berg, C. (2009). 27CMoraceae (*Ficus*). En Harling, G. y Persson, C. (Eds.), *Flora of Ecuador* (pp.79-81). Editorial Board.
- Bonkanka, C. (2006). Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna – Cajacanarias. España.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica – Plantas medicinales*. (pp: 306-330) Zaragoza: Acribia S.A.
- Cerón, C. & Montalvo, C. (1998). *Etnobotánica de los Huaorani de Quehueiri-ono Napo – Ecuador*. Quito: Abya – Yala.
- Chen, X., Wu, X., Chai, W., Feng, H., Shi, Y., Zhou, H. & Chen, Q. (2013). Optimization of extraction of phenolics from leaves of *Ficus virens*. *Journal of Zhejiang University Science B*, *14*(10), 903-915.
- Dolabela, M. (1997). Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, productos naturais e substancias sintéticas. Tesis de maestría. Universidad Federal de Minas Gerais. *Departamento de Fisiología e Farmacología, UFMG*, *21*(3), 130.
- Durán, C., Fonseca, R., & Ibarra, G. (2010) Estudio florístico de *Ficus* (Moraceae) en el estado de Guerrero. *Revista mexicana de biodiversidad*, *81*(2), 239-262.

- El-Sayed, A., Hetta, M., Yassin, N., Hassan, H., El-Awdan, S. & Afifi, N. (2013) Comparative DNA profiling, phytochemical investigation, and biological evaluation of two *Ficus* species growing in Egypt. *Pharmacognosy Research*, 5(4), 291.
- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L. Sefidkon, F., Cusido, R., Zamani, Z. & Palazon, J. (2013). Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI-MS. *Journal Food Chemistry*, 144, 139-145.
- Ibarra, G., Cornejo, G., González, N., Piedra, E. & Luna, A. (2012) El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences*, 90 (4), 389-452.
- Imeh, U. & Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 6301-6306.
- InBio. (2007). *Ficus citrifolia* P. Miller. Recuperado en 19 de abril de 2014, de: <http://darnis.inbio.ac.cr/ubisen/FMPro?-DB=UBIPUB.fp3y-lay=WebAlly-error=norec.htmlly-Format=detail.htmlly-Op=eqyid=257y-Find>
- González, N. & Ibarra, G. (2012). *Flora del Valle de Tehuacán - Cuicatlán – Moraceae*. Michoacan. (pp. 1-8). Recuperado en 8 de octubre de 2014, de: http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/F96_Mora.pdf
- González, N., Cornejo, G. & Ibarra, G. (2010). El género *Ficus* (Moraceae) en la provincia biogeográfica de la Depresión del Balsas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (87), 105-124. Recuperado en 25 de febrero de 2014, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0366-21282010000200009ylnng=esytlng=es.

- Graveson, R. (2012). *Ficus citrifolia* Herbal uses - Plants of Saint Lucia. Recuperado en 21 de abril de 2014, de <http://www.saintlucianplants.com/localuses/ficucitr.html>
- Guillermo, R. (2002). Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.
- Guo, X., Yue, Y., Tang, F., Wang, J., Yao, X. & Sun, J. (2013). A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode. *International Journal of Mass Spectrometry*, 333, 59-66.
- Gupta, N. & Jain, U. K. (2010). Prominent wound healing properties of indigenous medicines. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 1(1).
- Herbarium Hawaii. (2012, agosto 18). Moraceae. *Systematics of Vascular Plants*. University of Hawaii at Manoa, Department of Botany. Honolulu, HI. Recuperado de: <http://www.herbarium.hawaii.edu/bot461/query/details.php?family=Moraceae&field=family>
- Jørgensen, P.M. & S. León-Yáñez (eds.). (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden, 75, 216.
- Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. (pp: 107-109). Barcelona: Omega.
- Kupiec, T. (2004). *Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid*

Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8(3), 223-227.

Leon Levy Native Plant Preserve. (2014). *Ficus citrifolia*. Recuperado en 20 de marzo del 2014, de: <http://www.levypreserve.org/Plant-Listings/Ficus-citrifolia>

Lv, H., Zhang, X., Chen, X., Xie, Z., Hu, C., Wen, C. & Jiang, K. (2013). Phytochemical Compositions and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Crude Extracts from *Ficus pandurata* H. (Moraceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Marques, G., Leão, W., Lyra, M., Peixoto, M., Monteiro, R., Rolim, L., Xavier, H., Neto, P. & Soares, L. (2013). Comparative Evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), 51-57.

Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Medellín, Colombia. Recuperado en 2 de marzo del 2014 de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001>

Martínez, S., González, J., Culebras, J. & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Mawa, S., Husain, K. & Jantan, I. (2013). *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Recuperado de: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/974256/>

Misbah, H., Aziz, A. A. & Aminudin, N. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *BMC Complement Alternative Medicine*, 13(1), 118.

- Mittal, A., Sardana, S. & Pandey, A. (2013). Herbal boon for wounds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2).
- Nakilcioğlu, E. & Hışıl, Y. (2013). Research on the phenolic compounds in sarilop (*Ficus carica* L.) fig variety. *GIDA/The Journal of Food*, 38(5).
- Nworu, C. S., Nwuke, H. C., Akah, P. A., Okoye, F. B. & Esimone, C. O. (2013). Extracts of *Ficus exasperata* leaf inhibit topical and systemic inflammation in rodents and suppress LPS-induced expression of mediators of inflammation in macrophages. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 302-310.
- Ojeda, K. (2013). Estudio fitoquímico y actividad biológica de plantas utilizadas en medicina mapuche. Tesis de grado para obtener el título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile, Escuela de Química y Farmacia. Valdivia, Chile.
- Plascencia, G. (2003). Espectrometría de masas. *Curso de métodos Universidad Autónoma de México*, 1-2 y 30-32.
- Quattrocchi, U. (2012). *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology*. Recuperado en 25 de febrero de 2014, de:
http://books.google.com.ec/books?id=YC_lAgAAQBAJypg=PA1735ylpg=PA1735ydq=Ficus+citrifolia+usesysource=blyots=cT4mwbjd_vysig=pR6SzlswPIwCXUzz2VAVVi_23Eyhl=esysa=Xyei=cW5VU-HLA8zLsATK6oCYDQyved=0CHcQ6AEwCDgK#v=onepageyq=Ficus%20citrifolia%20usesyf=false
- Rivas, J. & García, M. (2002). Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación Nutrición y Salud*, 9 (2), 31-38.

- Rouessac, F. & Rouessac, A. (2003). *Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. España: McGRAW-HILL.
- Salvi, V., Joshi, Y., Dhande, S. & Kadam, V. (2013). A Review on *Ficus hispida*. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3), 149-154.
- Sánchez, J. (2009) Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Salamanca, España.
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]." will do. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Taskeen, A., Naeem, I., Mubeen, H. & Mehmood, T. (2009). Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic analysis of flavonoids in two *Ficus* species. *New York Science Journal*, 2(5), 32-35.
- Van Bramer, S. (1998). *An Introduction to Mass Spectrometry*. Widener University, EEUU. Recuperado en 24 de abril del 2015 de: <http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>
- Van Galen, P. (2005). *Mass Spectrometry. The Organic Chemistry Department*. Nijmegen University. Nijmegen, Países Bajos.
- Varas, D. (2004). Análisis de flavonoides en plantas medicinales del Sur de Chile con técnica HPLC. Tesis para optar por el título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias, Escuela de Química y Farmacia. Valdivia, Chile.

- Wang, X., Wie, X., Tian, Y., Shen, L. & Xu, H. (2010). Antifungal flavonoids from *Ficus sarmentosa* var. *henryi* (King) Corner. *Agricultural Sciences in China*, 9(5), 690-694.
- Yi, T., Chen, Q., He, X., So, S., Lo, Y., Fan, L., Xu, J., Tang, Y., Zhang, J., Zhao, Z. & Chen, H. (2013). Chemical quantification and antioxidant assay of four active components in *Ficus hirta* root using UPLC-PAD-MS fingerprinting combined with cluster analysis. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-9.
- Zhang, R., Yang, Y., Yingping, W., & Guixing, R. (2011). Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK -Ay mice. *Nutrition & Metabolism*, 8(85), 1-6.
- Zhekun, Z. & Gilbert, M. (2003). Moraceae. *Flora of China*, 5, 21-73.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de abreviaturas

TLC: Cromatografía de capa fina

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos

DPPH: 2,2-difenil-1-picril hidrazilo

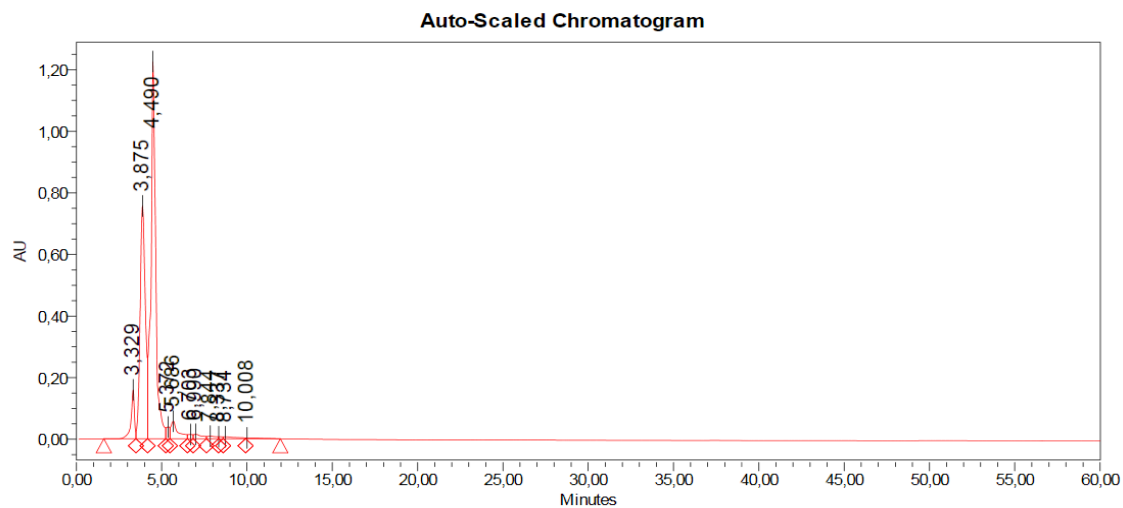
ABTS: Ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico

IC₅₀: Inhibición de la oxidación al 50%

GAE: Equivalente de ácido gálico

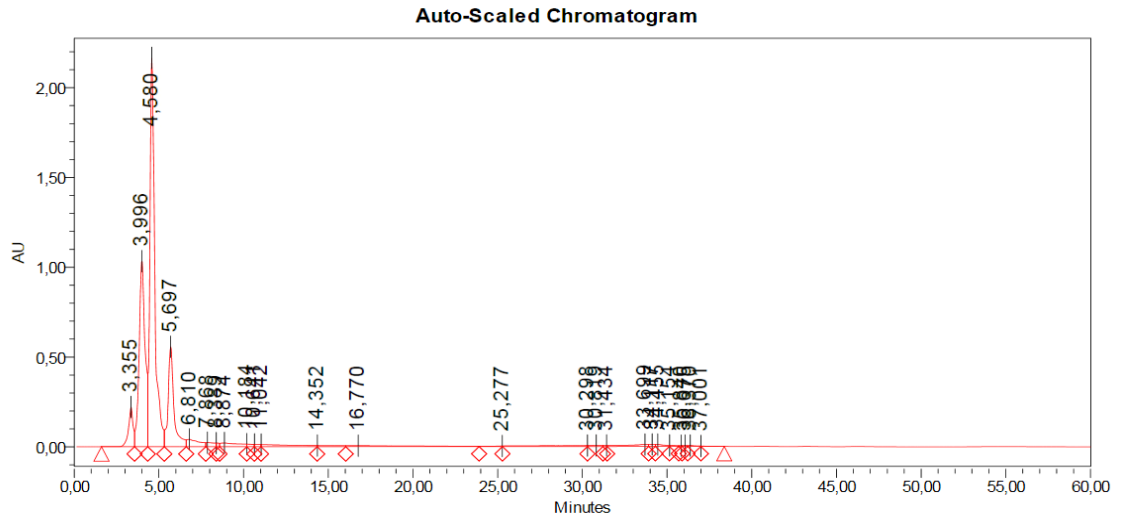
Membrana PDVF: membrana polivinildifluoruro

Anexo 2. Cromatograma de la Primera fracción (Rf 1) de *Ficus citrifolia* Mill. (HPLC-DAD)



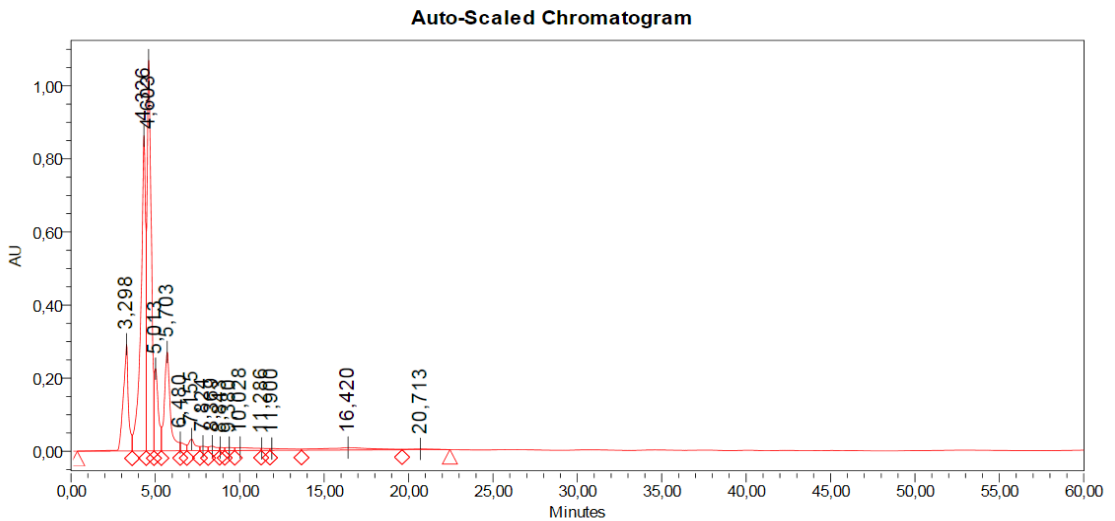
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 3. Cromatograma de la Segunda fracción (Rf 2) de *Ficus citrifolia* Mill. (HPLC-DAD)



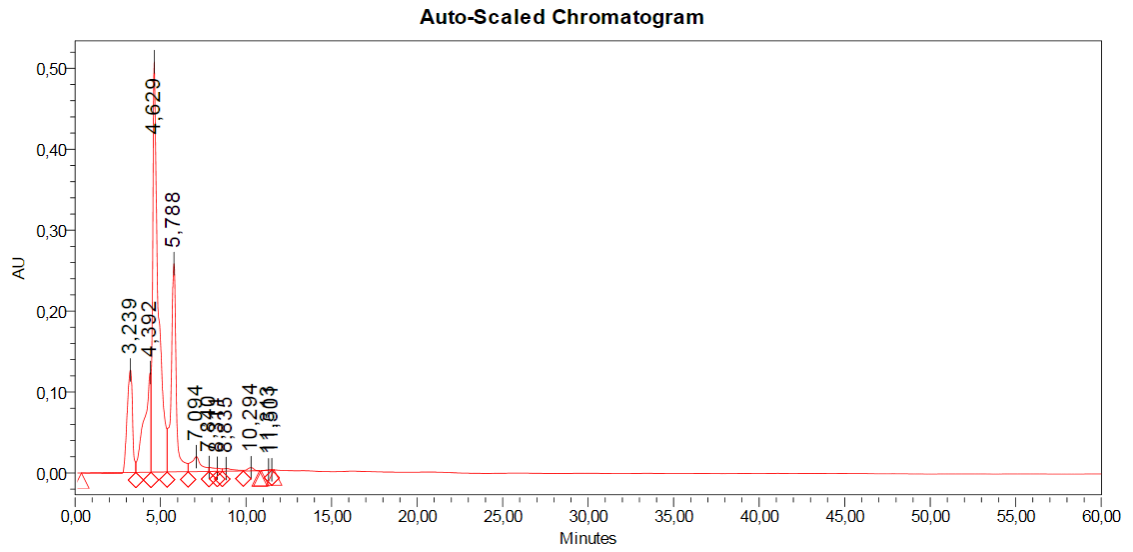
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 4. Cromatograma de la Tercera fracción (Rf 3) de *Ficus citrifolia* Mill. (HPLC-DAD)



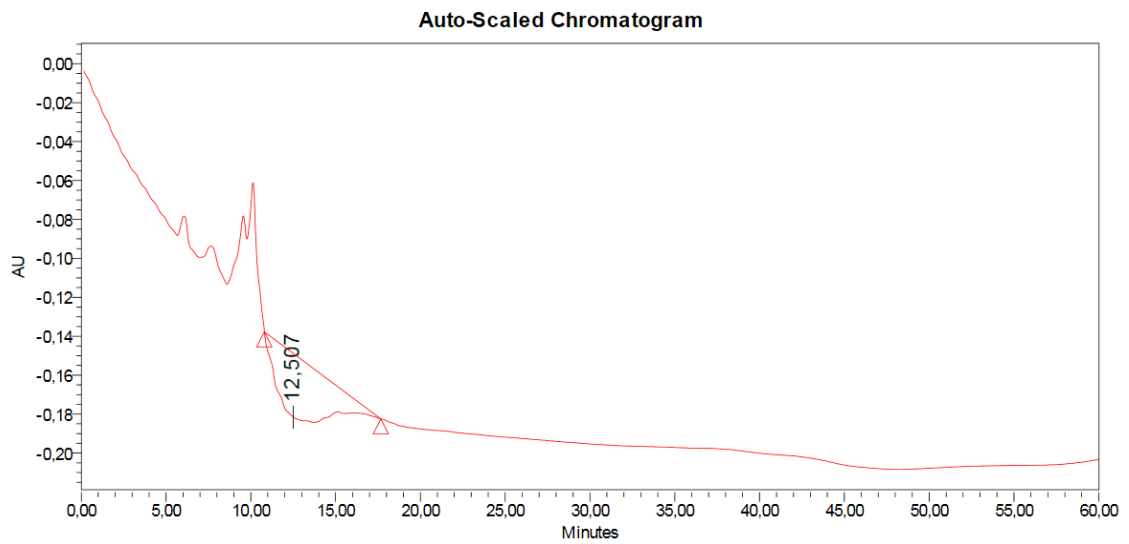
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 5. Cromatograma de la Cuarta fracción (Rf 4) de *Ficus citrifolia* Mill. (HPLC-DAD)



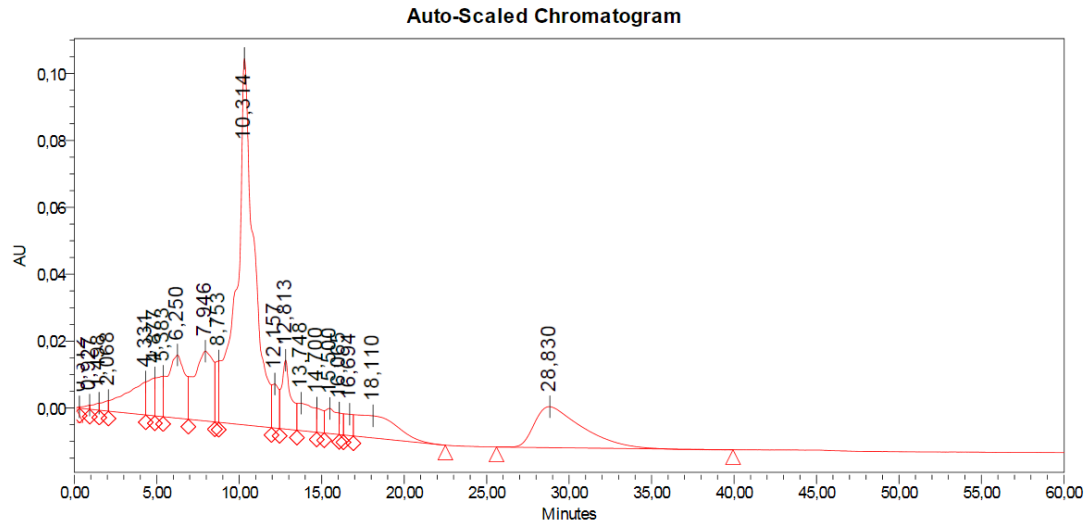
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 6. Cromatograma de la Quinta fracción (Rf 5) de *Ficus citrifolia* Mill. (HPLC-DAD)



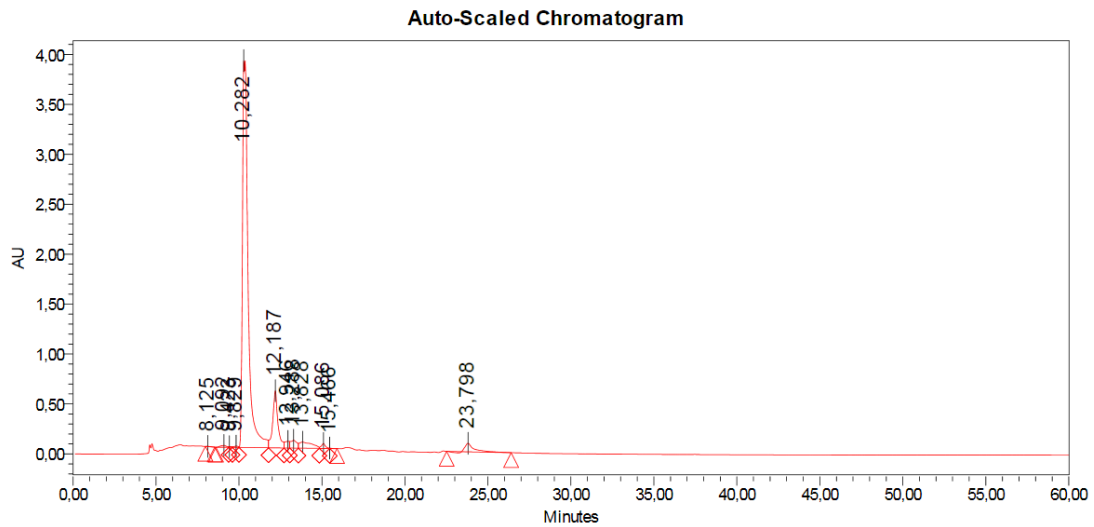
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 7. Cromatograma de la Sexta fracción (Rf 6) de *Ficus citrifolia* Mill. (HPLC-DAD)



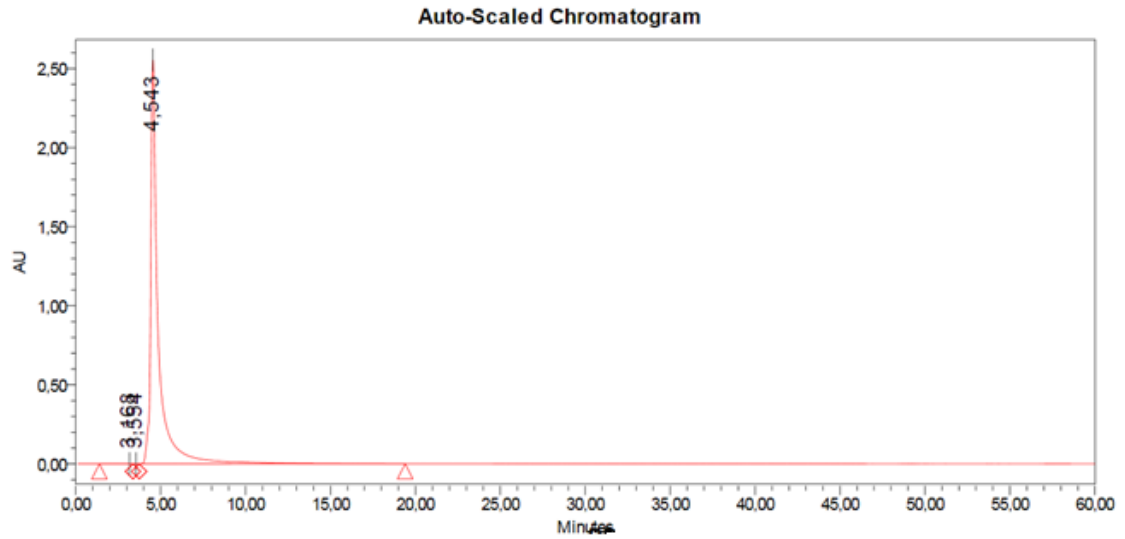
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 8. Cromatograma de luteolina (HPLC-DAD)



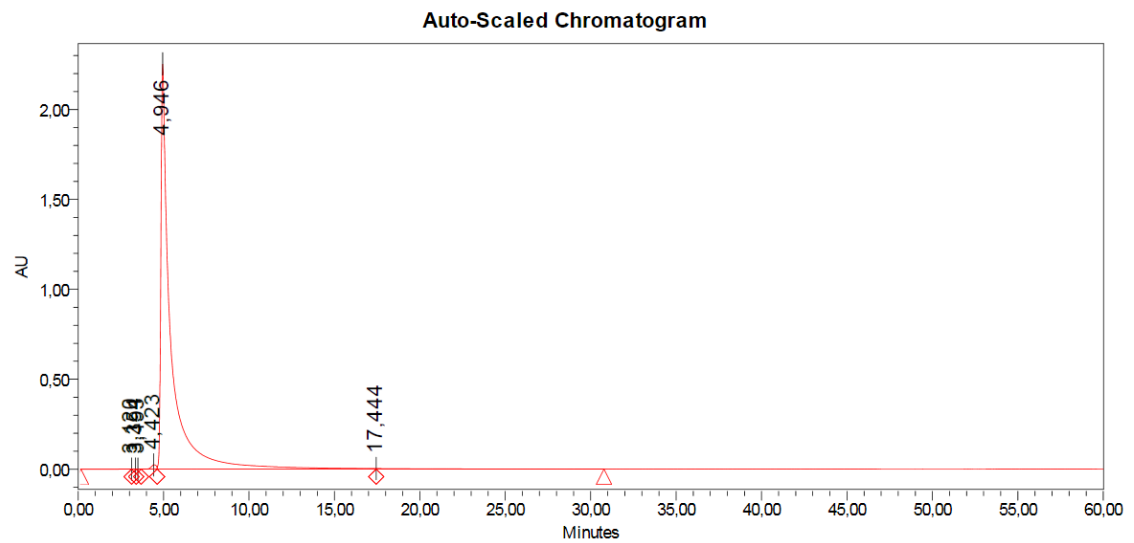
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 9. Cromatograma de miricetina (HPLC-DAD)



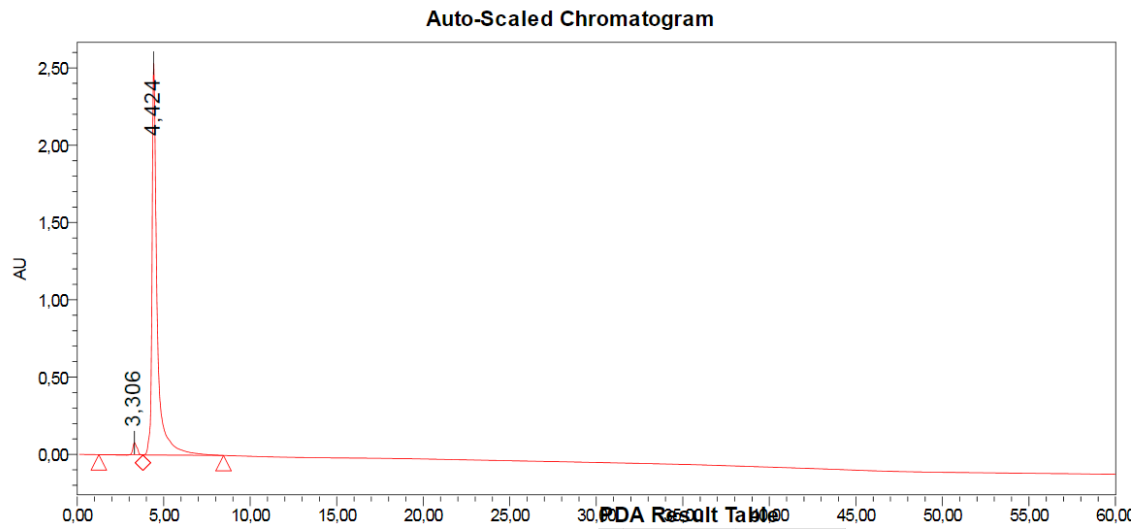
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 10. Cromatograma de kaenferol (HPLC-DAD)



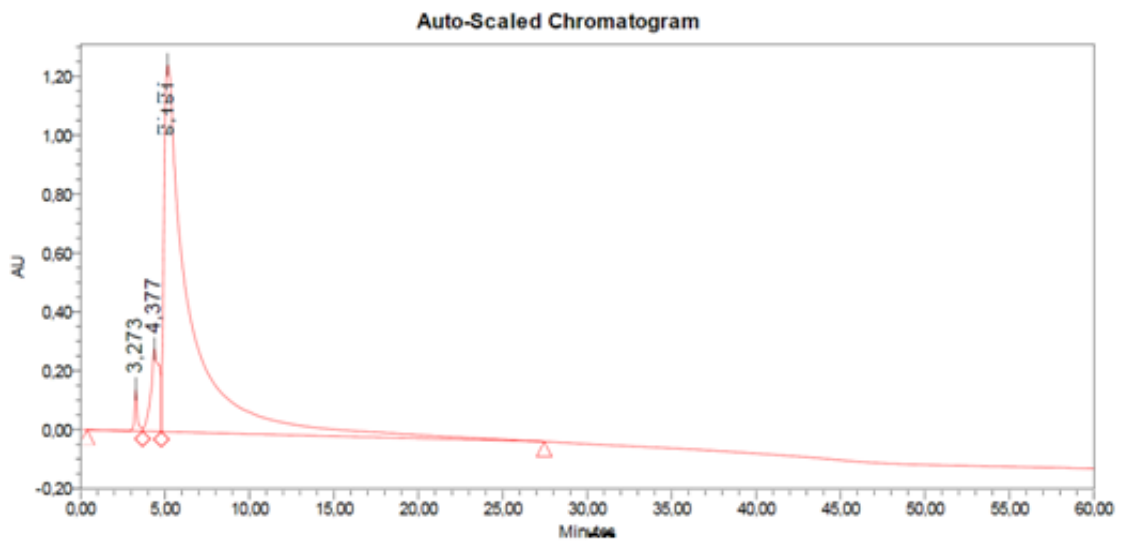
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 11. Cromatograma de hiperósido (HPLC-DAD)



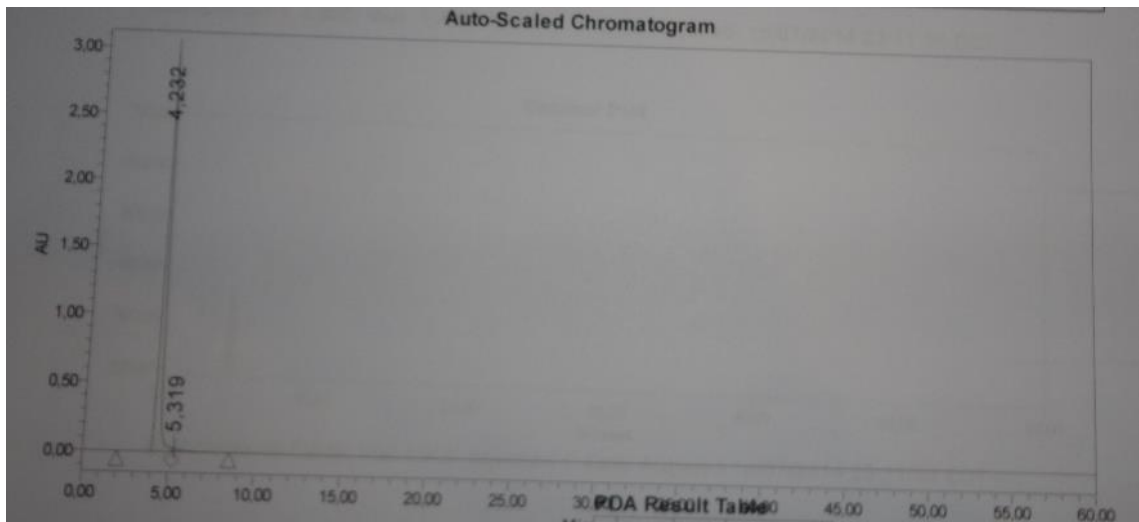
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 12. Cromatograma de morina (HPLC-DAD)



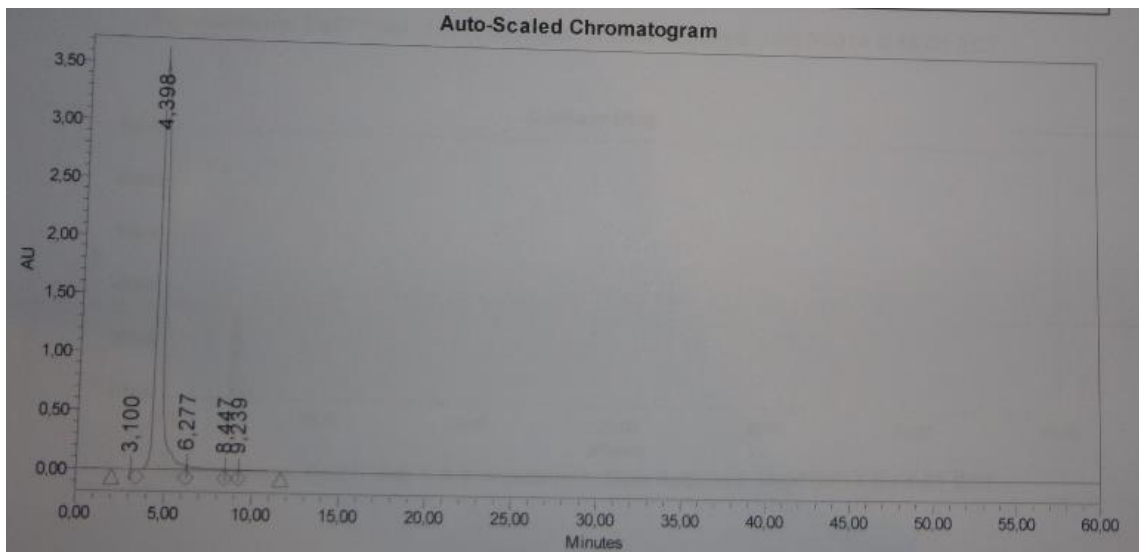
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 13. Cromatograma de naringina (HPLC-DAD)



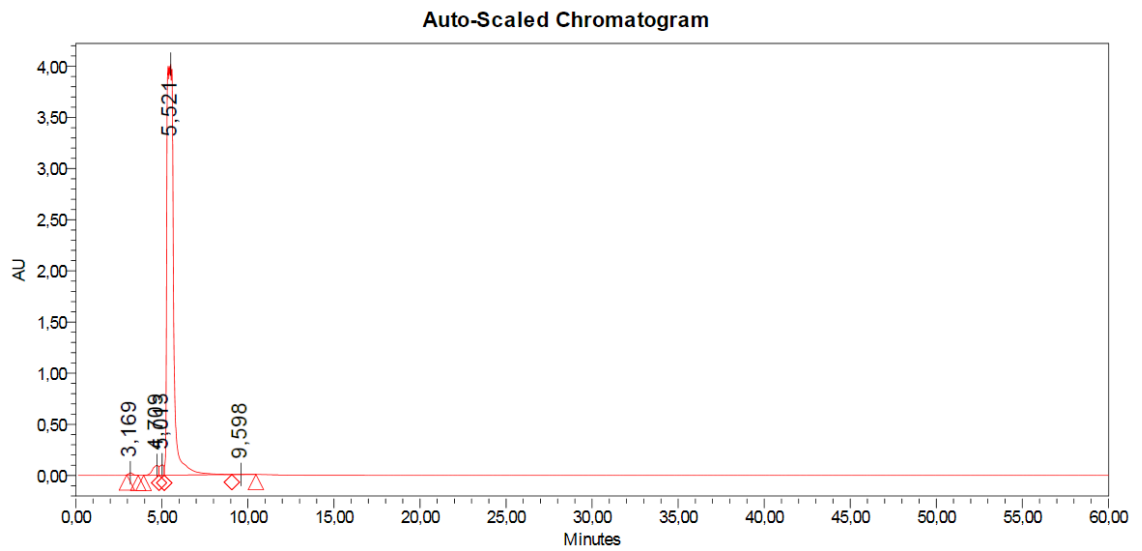
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 14. Cromatograma de silibina (HPLC-DAD)



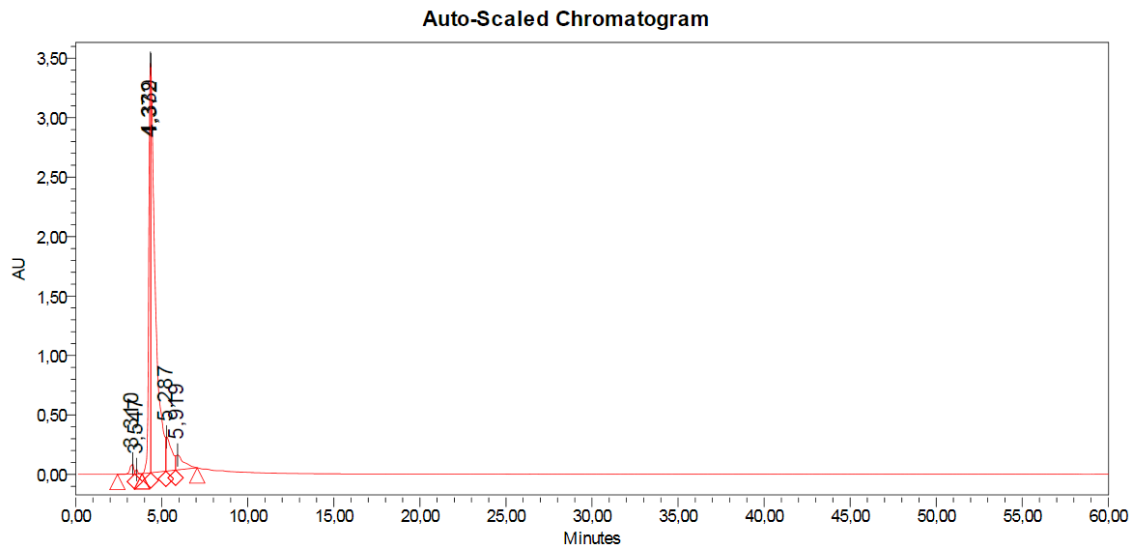
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 15. Cromatograma de hidroxiflavona (HPLC-DAD)



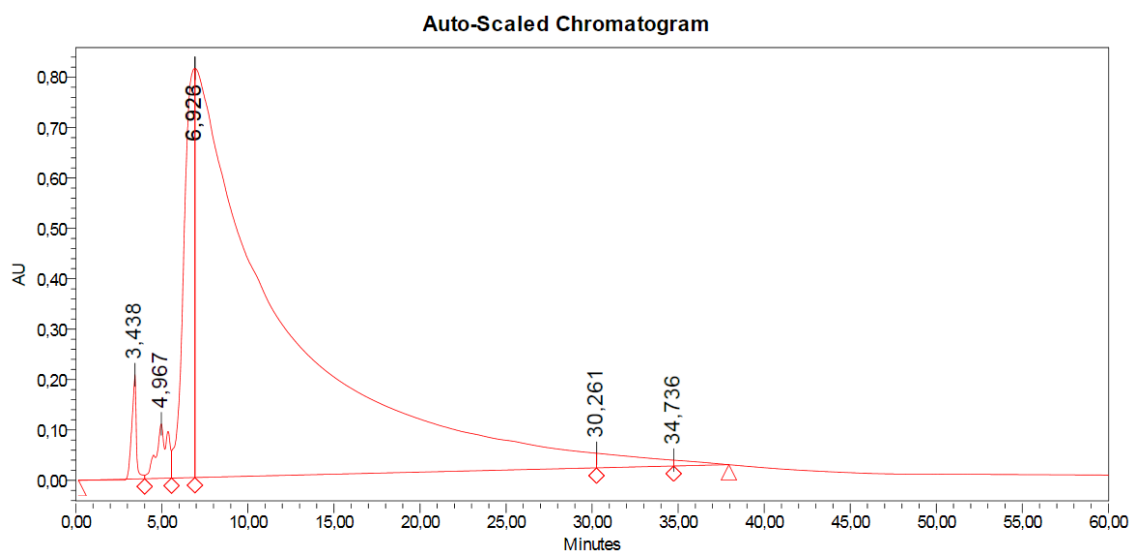
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 16. Cromatograma de rutina (HPLC-DAD)



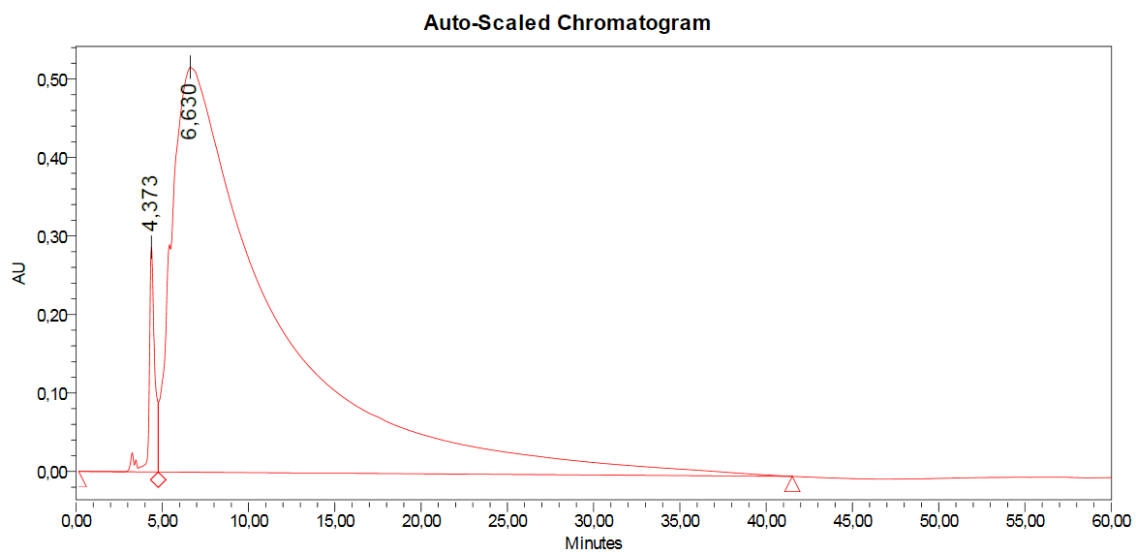
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 17. Cromatograma de baicaleina (HPLC-DAD)



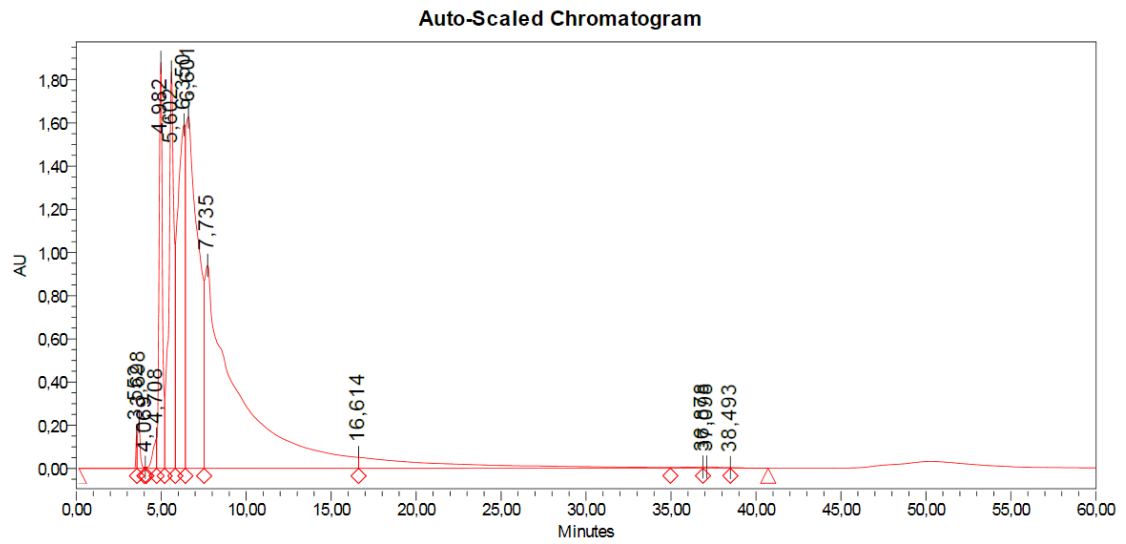
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 18. Cromatograma de quercetina (HPLC-DAD)



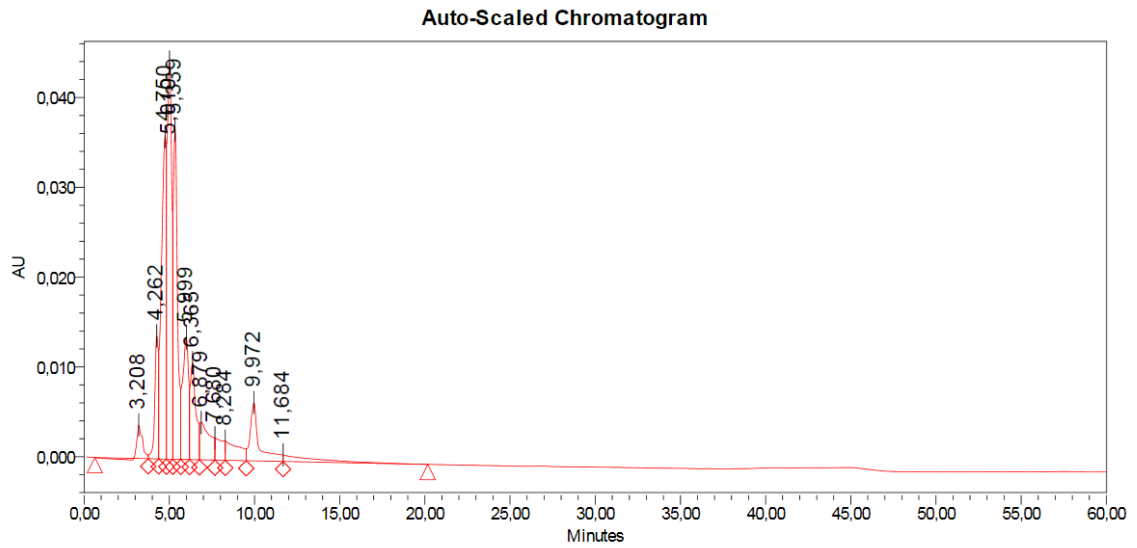
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 19. Cromatograma de crisina (HPLC-DAD)



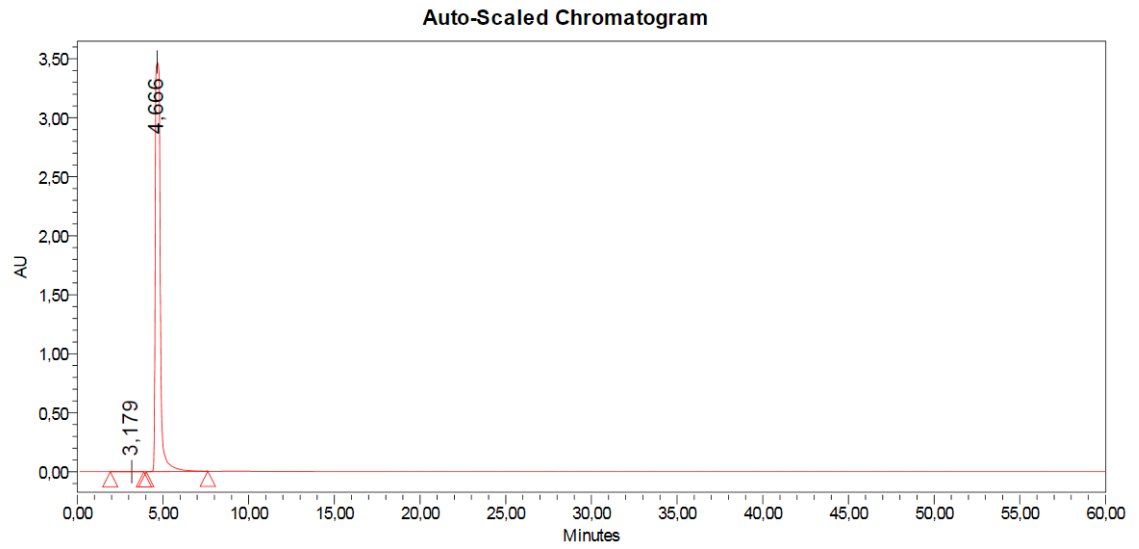
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 20. Cromatograma de diosmina (HPLC-DAD)



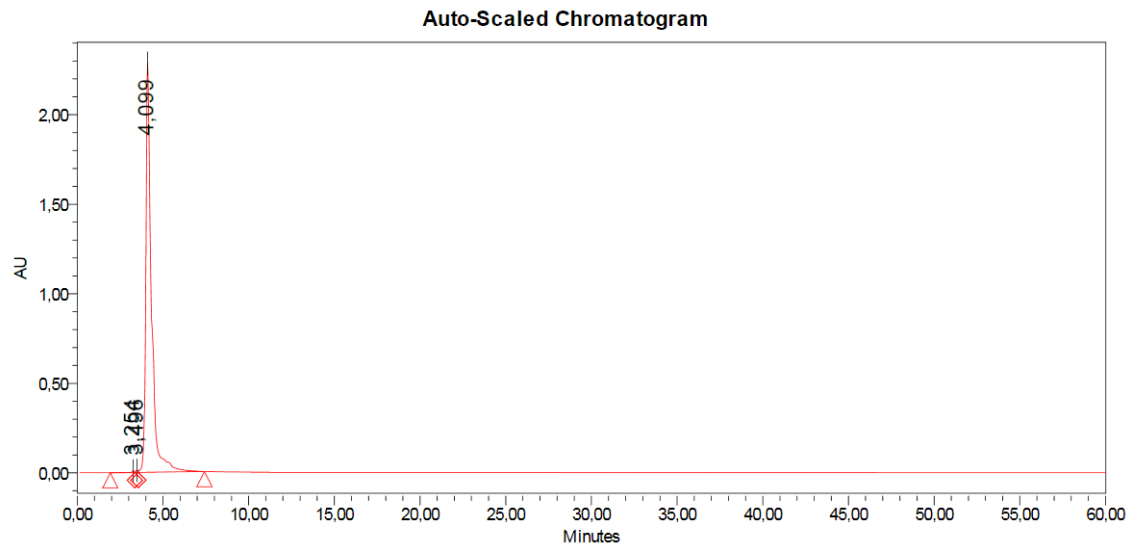
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 21. Cromatograma de daidzeina (HPLC-DAD)



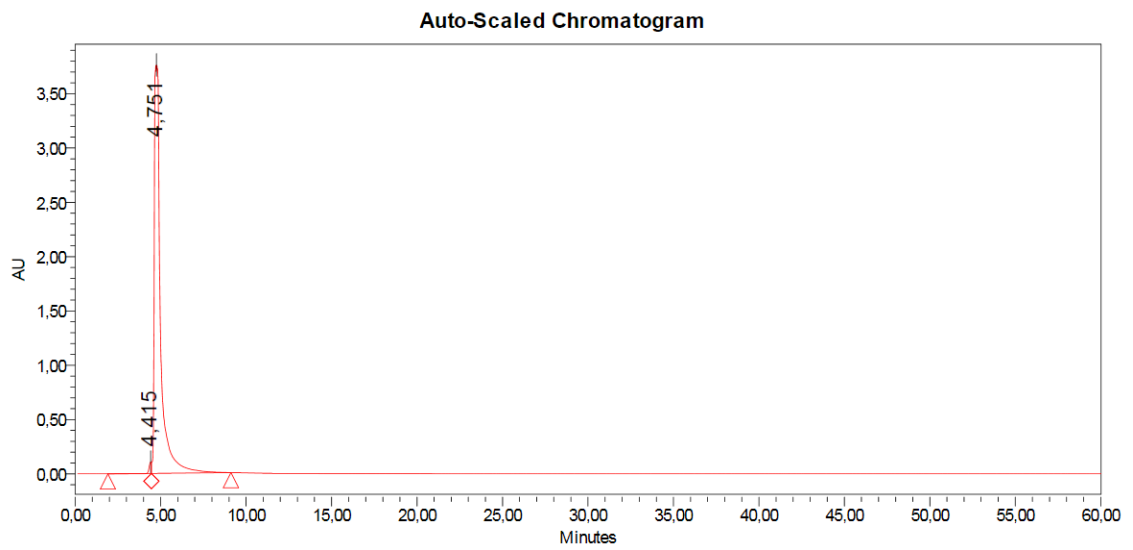
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 22. Cromatograma de epigallocatequina (HPLC-DAD)



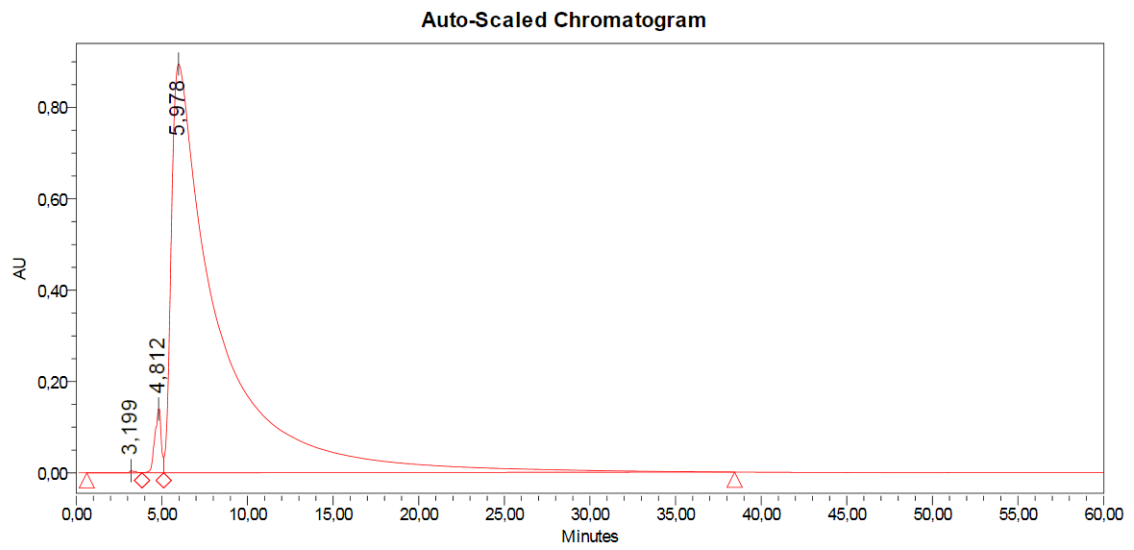
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 23. Cromatograma de genisteina (HPLC-DAD)



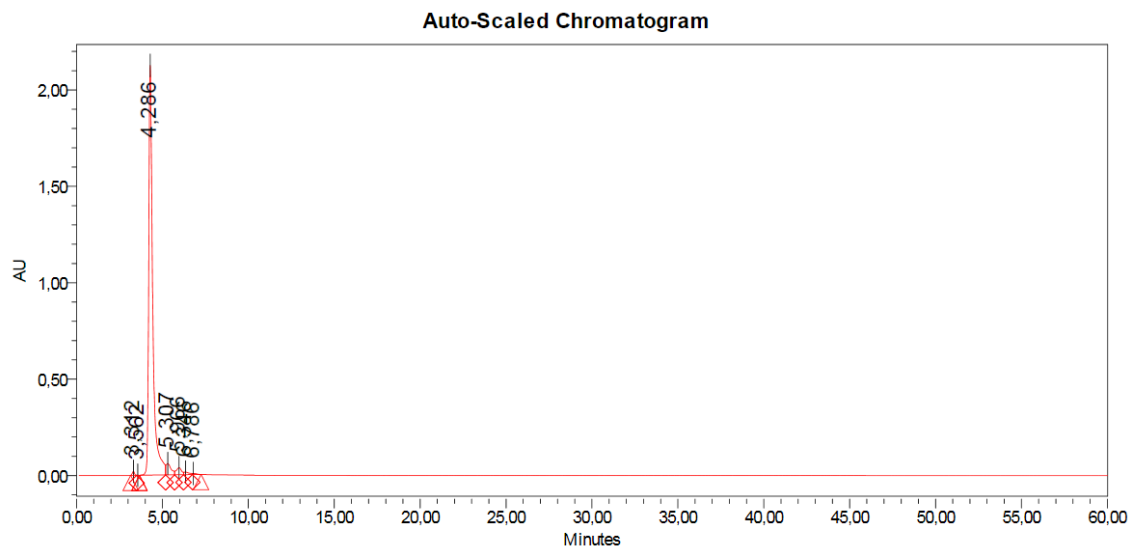
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 24. Cromatograma de apigenina (HPLC-DAD)



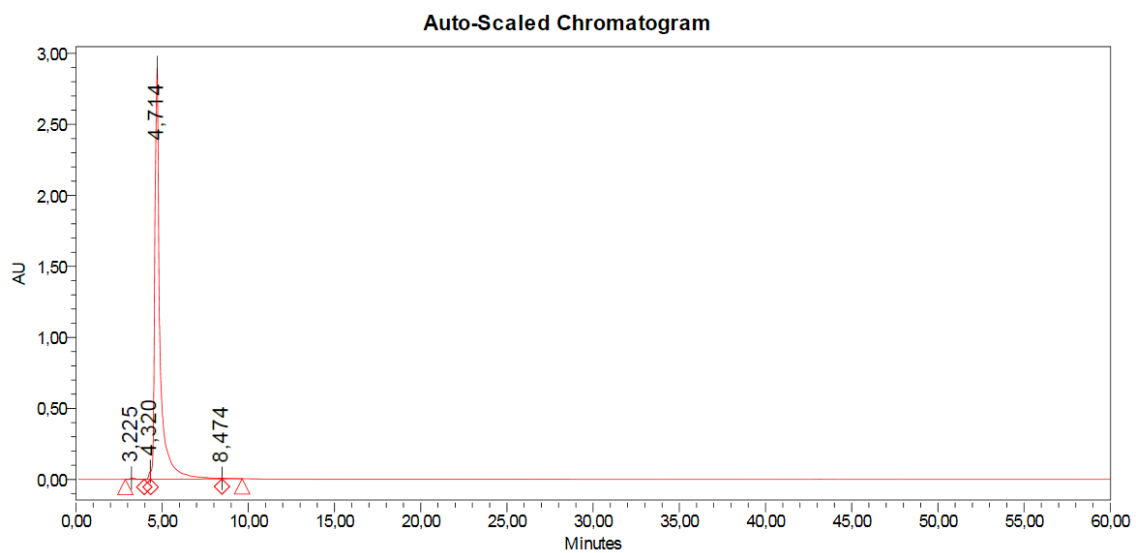
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 25. Cromatograma de hesperidina (HPLC-DAD)



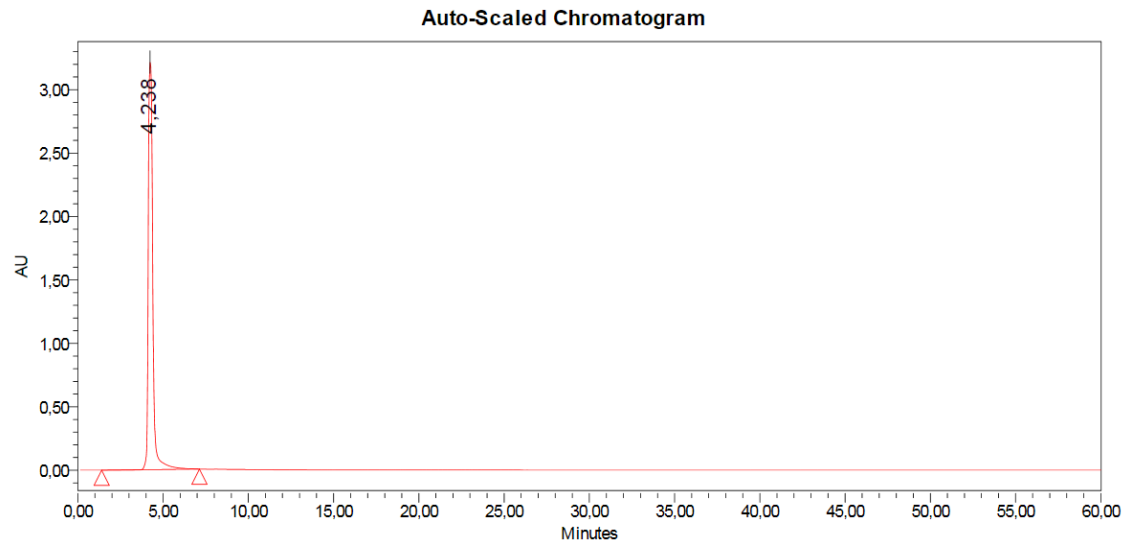
Nota: Elaborado por K. García

Anexo 26. Cromatograma de naringenina (HPLC-DAD)



Nota: Elaborado por K. García

Anexo 27. Cromatograma de catequina (HPLC-DAD)



Nota: Elaborado por K. García