



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDOS
FENÓLICOS POR HPLC-DAD EN LOS EXTRACTOS DE
LAS FLORES DE *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limetta* (lima)
y *Prunus pérsica* (durazno)**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR:

MARREROS CASTAÑEDA, SADITH HEINS

ORCID: 0000-0003-1458-9031

ASESOR:

ZEVALLOS ESCOBAR, LIZ ELVA

ORCID: 0000-0003-2547-9831

CHIMBOTE – PERÚ

2020

EQUIPO DE TRABAJO

AUTOR

Marrerros Castañeda, Sadith Heins

ORCID: 0000-0003-1458-9031

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Bachiller, Chimbote, Perú

ASESOR

Zevallos Escobar, Liz Elva

ORCID: 0000-0003-2547-9831

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias de La Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Chimbote, Perú

JURADO

DIAZ ORTEGA, JORGE LUIS

ORCID: 0000-0002-6154-8913

RAMIREZ ROMERO, TEODORO WALTER

ORCID: 0000-0002-2809-709X

RODAS TRUJILLO, KAREM JUSTHIM

ORCID: 0000-0002-8873-8725

**DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS
POR HPLC-DAD EN LOS EXTRACTOS DE LAS FLORES DE *Citrus
sinensis* (naranja), *Citrus limetta* (lima) y *Prunus persica* (durazno)**

JURADO EVALUADOR DE TESIS Y ASESOR

Dr. Jorge Luis Ortega Díaz

PRESIDENTE

Mgtr. Teodoro Walter Ramírez Romero

MIEMBRO

Mgtr. Karen Justhium Rodas Trujillo

MIEMBRO

Mgtr. Liz Elva Zevallos Escobar

ASESOR

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, gracias a Dios por darme la posibilidad de existir y de disfrutar cada día de todas sus bendiciones, también por ser mi guía y fortaleza en los momentos más difíciles, por brindarme una vida llena de experiencias, aprendizajes y felicidad, ayudándome a comprender mis errores, para así no cometerlos otra vez.

Del mismo modo agradezco a mis amados padres Juliana Castañeda y Sergio Marreros, quienes son mis pilares y fortaleza, les agradezco su sacrificio y esfuerzo para proporcionarme una profesión y creer en mi capacidad, aunque hemos tenido momentos difíciles constantemente han estado brindándome su comprensión, cariño y amor.

Finalmente, pero no menos importante a mis docentes Liz Zevallos, Mily Ormeño y Edison Vázquez, por sus enseñanzas, paciencia y comprensión en todo el transcurso de mi desarrollo académico ya que sin su ayuda no hubiera logrado realizar este proyecto.

Gracias a mis maestros, amigos, compañeros y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de mi trabajo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, haberme dado salud para alcanzar mis objetivos, además por estar conmigo en todo momento fortaleciendo mi corazón e iluminando mi mente, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este periodo, dándome las fuerzas para seguir adelante sin desfallecer.

A mi madre y a mi padre, por darme la vida, por amarme mucho y por creer en mí, por ser mi motivación y mi fortaleza, porque nunca me abandonaron ya que siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona, no podría sentirme más dichosa con la confianza depositada sobre mí, especialmente cuando he contado con su incondicional apoyo perfectamente mantenido desde que tengo memoria, todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A mis hermanos por sus consejos, confianza, compañía y cariño, por ser un ejemplo a seguir de los cuales aprendí a no darme por vencida en los momentos difíciles.

RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivo Determinar el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD en los extractos de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*. El análisis de flavonoides y ácidos fenólicos se llevó a cabo en un HPLC-DAD Hitachi Chromaster con un detector 352 nm y un volumen de inyección 10 µL, la cantidad de ácido clorogénico en las flores de *Citrus sinensis* en el extracto metanólico fue 2.46 mg, infusión 2.74 mg y decocto 2.51 mg, en *Prunus pérsica* en extracto metanólico 22 mg, infusión 33.79 mg y decocto 27.92 mg/g, en cuanto a rutina el contenido en *Citrus sinensis* extracto metanólico fue 2.65 mg, infusión 3.03 mg, decocto 2.45mg, en *Citrus limetta* extracto metanólico 4.59 mg, infusión 6.69 mg y decocto 6.59 mg y en *Prunus pérsica* extracto metanólico 2.49 mg, infusión 2.72 mg y decocto 2.59 mg y para quercetina en *Citrus sinensis* extracto metanólico 507.29 µg, infusión 355.41 µg, decocto 320.21 µg, en *Citrus limetta* extracto metanólico 1576.81 µg, infusión 318.72 µg, decocto 610.61 µg, y en *Prunus pérsica* extracto metanólico 1162.95 µg, infusión 1666.02 µg y decocto 1234.94 µg/g de muestra seca. Los resultados obtenidos demuestran que las flores estudiadas son una fuente rica tanto en flavonoides como en ácidos fenólicos los cuales contribuirían a mejorar la salud.

Palabras claves: Ácidos fenólicos; *Citrus limetta*; *Citrus sinensis*; Flavonoides; HPLC-DAD; *Prunus pérsica*.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to determine the content of flavonoids and phenolic acids by HPLC-DAD in the extracts of the flowers of *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* and *Prunus pérsica*. The analysis of flavonoids and phenolic acids was carried out on a Hitachi Chromaster HPLC-DAD with a 352 nm detector and an injection volume of 10 µL, the amount of chlorogenic acid in the *Citrus sinensis* flowers in the methanolic extract was 2.46 mg, infusion 2.74 mg and decoct 2.51 mg, in *Prunus persica* in methanolic extract 22 mg, infusion 33.79 mg and decoct 27.92 mg / g, regarding rutin the content in *Citrus sinensis* methanolic extract was 2.65 mg, infusion 3.03 mg, decoct 2.45mg, in *Citrus limetta* methanolic extract 4.59 mg, infusion 6.69 mg and decocto 6.59 mg and in *Prunus pérsica* methanolic extract 2.49 mg, infusion 2.72 mg and decoct 2.59 mg and for quercetin in *Citrus sinensis* methanolic extract 507.29 µg, infusion 355.41 µg, decoct 320.21 µg, in *Citrus limetta* methanolic extract 1576.81 µg, infusion 318.72 µg, decoct 610.61 µg, and in *Prunus pérsica* methanolic extract 1162.95 µg, infusion 1666.02 µg and decoct 1234.94 µg / g of dry sample. The results obtained show that the studied flowers are a rich source of both flavonoids and phenolic acids, which contribute to improving health.

Keywords: *Citrus limetta*; *Citrus sinensis*; Flavonoids; HPLC-DAD; Persian *Prunus*; phenolic acids.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
	2.1. ANTECEDENTES.....	5
	2.2. BASES TEÓRICAS.....	8
	2.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	8
	2.2.2. FLAVONOIDES	12
	2.2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 18	
III.	HIPÓTESIS	27
IV.	METODOLOGÍA	27
	4.1. Diseño de la investigación.....	27
	4.2. Población y muestra.....	27
	4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores...28	
	4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	29
	4.4.1. Recolección de la muestra	29
	4.4.2. Preparación de la muestra	29
	4.4.3. Preparación del extracto metanólico.....	29
	4.4.4. Preparación de infusión.....	30
	4.4.5. Preparación de decocto.	30
	4.4.6. Análisis por HPLC-DAD.....	30
	4.6. Matriz de consistencia	32

4.7. Principios éticos.....	33
V. RESULTADOS	34
5.1. RESULTADOS	34
5.2. ANÁLISIS DERESULTADOS.....	40
VI. CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

INDICE DE GRAFICOS.

Grafico 1: Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de las flore de <i>Citrus sinensis</i> (naranja). -----	344
Grafico 2: Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de las flore <i>Citrus limetta</i> (lima)-----	344
Grafico 3: Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de las flore de <i>Prunus pérsica</i> (Durazno)-----	355
Grafico 4: Cromatograma correspondiente a infusión de las flore de <i>Citrus sinensis</i> (naranja).-----	345
Grafico 5: Cromatograma correspondiente a infusión de las flore <i>Citrus limetta</i> (lima) -----	346
Grafico 6: Cromatograma correspondiente a infusión de las flore de <i>Prunus pérsica</i> (Durazno)-----	346
Grafico 7: Cromatograma correspondiente a decocto de las flore de <i>Citrus sinensis</i> (naranja).-----	344
Grafico 8: Cromatograma correspondiente a decocto de las flore <i>Citrus limetta</i> (lima) -----	344
Grafico 9: Cromatograma correspondiente a decocto de las flore de <i>Prunus pérsica</i> (Durazno)-----	355

INDICE DE TABLA.

Tabla 01: Contenido de ácido clorogénico, rutina y quercetina mg y μ g por gramo de muestra seca correspondiente al extracto metanólico y extracto acuoso (infusión y decocto) en las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*. 362

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han venido desarrollando parte muy trascendental de la historia y la cultura de los diferentes pueblos indígenas esto refiere a su uso y también aplicación como remedio para tratar las diversas enfermedades que los aquejaban, constituyendo así un conocimiento que fue transmitido de forma oral de generación en generación. Además, se debe tener en cuenta que este es un método barato, eficaz y de fácil administración que tiene como base testimonios de personas tratadas con este método teniendo resultados satisfactorios, pero si se consumen en dosis excesivas pueden ser perjudiciales para la salud.¹

Hasta el día de hoy las poblaciones entorno al mundo siguen usando las plantas con propiedades medicinales como derivación de circunstancias históricas, manejo etnobotánica o creencias culturales las cuales ayudaron a satisfacer sus necesidades sanitarias.² En los países en vías desarrollo, el extenso uso de este tipo de terapias se atribuye a la fácil accesibilidad y asequibilidad, ya que en muchas ocasiones es la única fuente disponible para la atención sanitaria, especialmente para aquellos personas de más escasos recursos; además es muy popular por estar sólidamente arraigada en las creencias.³

Por su parte, la Organización Mundial de Salud (OMS) ha insistido en cuanto al uso de plantas medicinales ya que estas pueden ser de gran ayuda en la atención primaria de los sistemas de salud, pero estas deben estar sustentadas científicamente para asegurar eficacia, calidad y seguridad requeridas para la aplicación en humanos.⁴

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, diversos en estructura química y características, que se encuentran en todas partes en las plantas. Por lo tanto, los flavonoides son parte de la dieta humana. Se han identificado más de 4.000 flavonoides diferentes dentro de las principales clases de flavonoides se incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalcones.⁵ varían en sus características estructurales alrededor del anillo de oxígeno heterocíclico. Las flavanonas se encuentran predominantemente en las frutas cítricas, las flavonas en las hierbas, los isoflavonoides en las legumbres, las antocianinas y las catequinas en las frutas y los flavonoles en todas las frutas y verduras.⁶

Los flavonoides son potentes antioxidantes, eliminadores de radicales libres y quelantes de metales e inhiben la peroxidación lipídica. Los requisitos estructurales para las funciones antioxidantes y de eliminación de radicales libres de los flavonoides incluyen un grupo hidroxilo en la posición de carbono tres, un doble enlace entre las posiciones de carbono dos y tres, un grupo carbonilo en la posición de carbono cuatro y polihidroxilación de los anillos aromáticos A y B.⁵

Los ácidos fenólicos pertenecen a dos clases diferentes, los ácidos hidrobenczoicos (HBA) y los ácidos hidroxinámicos (HCA), los cuales derivan de dos moléculas no fenólicas que son ácido benzoico y cinámico respectivamente. A diferencia de otros compuestos fenólicos, los ácidos fenólicos presentan carácter ácido debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula. Estos también están ampliamente incorporados en las plantas, aunque su distribución puede variar mucho según la especie. Los

ácidos fenólicos claramente desempeñan un papel tanto en las interacciones entre la planta y su entorno biótico o abiótico, así también como en las cualidades organolépticas y nutricionales de las frutas, verduras, legumbre, etc. Así mismo sus propiedades antioxidantes, son esenciales en los mecanismos de defensa de los sistemas biológicos.⁷

La tendencia mundial de la alimentación, en los últimos años, tiene un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos que, además de contener nutrientes, contengan sustancias fisiológicamente activas que cumplan, al igual que los nutrientes esenciales, una función beneficiosa en la prevención de ciertas enfermedades. A estos alimentos, se les ha denominado “alimentos funcionales” y se viene realizando la identificación de ciertos principios activos, a fin de evaluar su seguridad y las dosis respectivas a utilizar, estableciéndose, en la mayoría de casos, marcadores analíticos, marcadores farmacológicos; realizándose, además, ensayos clínicos controlados a doble ciego, demostrando sus efectos bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos.⁸ por tanto el hecho de determinar el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos de las flores de las especies en estudio se tiene la intención de contribuir a la identificación o aislamiento de compuestos bioactivos para diversos fines.

Se propuso la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos en los extractos de las flores *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*?

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General:

Determinar el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD en los extractos de las flores de *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limetta* (lima) y *Prunus pérsica* (durazno)

Objetivos específicos:

1. Obtener el cromatograma de los extractos de las flores *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.
2. Determinar la concentración de flavonoides y ácidos fenólicos en los extractos de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Theuter et al.⁹ realizó un estudio en el 2012 que tuvo como objetivo dilucidar los perfiles fenólicos en la piel del fruto de ciruelas *Prunus* doméstica y especies relacionadas, Mediante HPLC-DAD, obteniéndose como compuestos predominantes dentro de las antocianinas los glucósidos de cianidina y peonidina, y la rutina fue el flavonol principal, mientras que el ácido neoclorogénico y el ácido n-clorogénico fueron los principales ácidos hidroxicinámicos. Además de estas clases fenólicas principales, también se encontraron un grupo de flavonas tentativamente identificadas y varios flavonoides acilados.

Venter, Joubeth y Beer.¹⁰ en un estudio realizado en Sudáfrica en el año 2013, tuvieron como propósito realizar la caracterización fenólica de 11 cultivos de *Prunus salicina* Lindl incluidos varios tipos con piel y pulpa amarilla y roja, mediante un método mejorado de HPLC-DAD para cuantificar ácidos fenólicos, antocianinas y flavonoles, dentro de los cuales los principales compuestos fue el ácido neocloreogenico y el cianidin-3-O-glucósido encontrados en todas las clases de ciruelas estudiadas.

Tenorio¹¹ en un estudio realizado en el año 2016 en Perú, tuvo como objetivo obtener flavonoides de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticula*, x *citrus paradisi*) y aplicarlos como, antioxidante natural en el aceite vegetal Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). La identificación y cuantificación de flavonoides se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), encontrando

en los extractos metanolico y acuoso naringina, hesperidina, neohesperinina y rutina.

Damían-Reyna et al¹², en un estudio realizado en México con el objetivo de determinar el contenido total de fenólicos, flavonoides totales, hesperidina y ácido ascórbico en bagazo, jugo y semilla de *Citrus limetta* y *Citrus reticulata* en dos etapas de madurez comercial, así como su efecto bactericida en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron que los bagazos tenían el mayor contenido total de fenoles, flavonoides totales y hesperidina para *C. limetta* y *C. reticulata*; los contenidos más altos de ácido ascórbico se encontraron en el jugo de *C. limetta* y el bagazo de *C. reticulata*. El contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides totales y hesperidina, así como el efecto bactericida, aumentaron con la madurez.

Estrada,¹³ en estudio que tuvo como objetivo explorar la existencia de interacciones fisicoquímicas entre algunos flavonoides de *Citrus limetta* y *Citrus aurantium* y la matriz de β -ciclodextrina y pectina en un sistema modelo y en un producto a base de estos dos cítricos, y evaluar el efecto sobre su actividad hipocolesterolémica e hipoglucemiante en un modelo animal. Demostró en el análisis de flavonoides mediante HPLC la presencia de eriocitrina, hesperidina, neohesperidina, naringina, hesperidina y neoeriocitrina en jugos frescos de lima y naranja agria.

Peterson, et.¹⁴ en una revisión crítica, con la finalidad de desarrollar una base de datos para flavanonas, la clase de flavonoides dominante en el género cítrico, buscó en la literatura científica relevante sobre flavonoides, en toronja, limones y limas, detallando ocho flavanonas (didymin, eriocitrin, hesperidin,

naringin, narirutin, neoeriocitrin, neohesperidin, poncirin). La toronja tenía un contenido total de flavanona como agliconas y un perfil distintivo de flavanona, dominado por naringina. Para los limones y para las limas los perfiles estaban dominados por hesperidina y eriocitrina.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

2.2.1.1. *CITRUS SINENSIS* (NARANJA)



Taxonomía.¹⁵

Reino: *Plantae*

Familia: *Rutaceae*

Subfamilia: *Aurantideae*

Tribu: *Aurantieae*

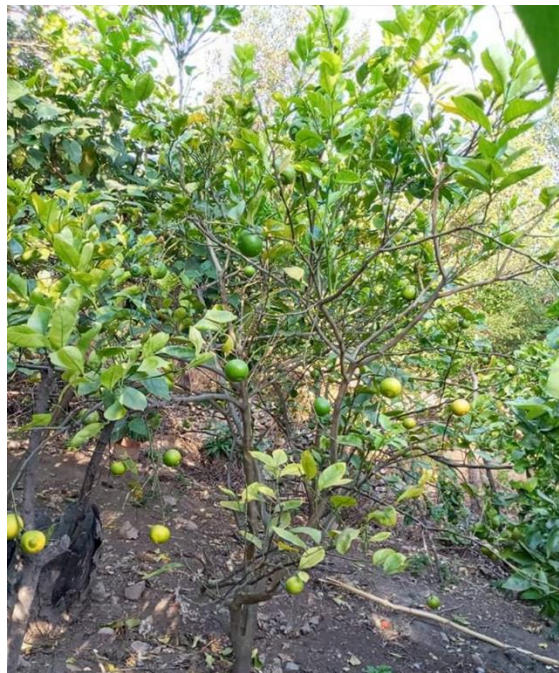
Género: *Citrus*.

Especie: *Citrus sinensis*.

Nativa de Asia, es una planta que se cultiva ampliamente en regiones tropicales y subtropicales. Árbol de tamaño pequeño a medio que puede llegar a medir hasta 6 m, de copa redondeada; en sus ramas tiene espinas flexibles, delgadas, ocasionalmente ausentes. Sus hojas son elípticas que pueden medir de 6 a 11 cm de largo. Fruto globular u ovalado de pulpa amarillenta, dulce.^{16,17}

Las flores son blancas y aromáticas generalmente emergen en gran abundancia en racimos terminales o axilares. En la individualidad de la flor, contiene un cáliz el cual tiene la forma de una copa en la base y termina con cinco verdosos y erectos sépalos, cuya cara externa está envuelta de cuantiosas glándulas de aceite. El resto de la flor surge de un receptáculo carnoso, del cual emergen de tres a cinco pétalos blancos, que la parte inferior son rectos y en la parte superior curvos hacia afuera, en el interior los tejidos están cubierto de pelos muy suaves. Los estambres están compuestos en series de cuatro o cinco, los cuales contiene de 20 a 25 estambre cada uno, los filamentos son delgados y terminan en anteras de cuatro sacos. su ovario elipsoidal al inicio contiene 10 celdas, cada una de ellas con muchos óvulos. El estilo es cilíndrico y grueso y termina en un estigma globoso. Su floración se da en primavera y su fruto madura en el otoño.¹⁸

2.2.1.2. CITRUS LIMETTA (LIMA)



Taxonomía.¹⁹

Reino: *Plantae*

Familia: *Rutáceas*

Subfamilia: *Aurantideae*

Clase: **Dicotiledóneas**

Género: *Citrus*.

Especie: *Citrus limetta*.

Originaria de Asia tropical, es cultivada en regiones tropicales y subtropicales. Es árbol bajo y de porte irregular, protegido con espinas gruesas. Hojas ovales y aserradas de 5 a 7.5 cm. Las flores son blancas y pequeñas, contienen un cáliz el cual tiene la forma de una copa en la base y termina con sépalos, de la flor surge de un receptáculo carnoso, de donde nacen de tres a cinco pétalos, que en la parte inferior son rectos y en la parte superior curvos, los estambres están compuestos en series de cuatro o cinco de 20 a 25 estambre cada uno. su ovario elipsoidal al inicio contiene 10 celdas, cada una de ellas con muchos óvulos. El fruto es mediano, casi esférico con bordes suaves con una hendidura en la base, color amarillo pálido puede llegar a medir de 5 a 7 cm de diámetro y su zumo varía entre ligeramente dulce a insípido.^{17,18}

2.2.1.2. *PRUNUS PÉRSICA* (DURAZNO).



Taxonomía.²⁰

Reino: *Plantae*

Familia: *Rosaceae*

Subfamilia: *Amygdaloideae*

Trubu: *Amygdaleae*

Género: *Prunus*.

Especie: *Prunus persica*.

Originario de China, es cultivada en zonas con climas templados, cálidos y fríos, es por ello que actualmente se encuentra diseminado por todo el mundo, es un árbol mediano, de 4 a 6 m de alto, sus hojas son lanceoladas anchas, de 8 a 15 cm de longitud, las flores son hermafroditas y aparecen solitarias o agrupadas de dos, el color va variar según la variedad y oscilara entre color rosa muy pálido a rosa fuerte, casi rojo, de 2 a 3.5 cm de diámetro, cada yema

floral produce una flor axilar completa, el cáliz es gamosépalo; la corola está compuesta por cinco pétalos dispuestos alternadamente con los sépalos. Contiene de 25 a 30 estambres, los cuales van están insertados en los bordes del receptáculo y nacen en el fondo de la copa, por lo cual el ovario fecundado formara una drupa sípera monosperma. la floración se da desde los primeros días de julio hasta fines de setiembre.^{21,22,23}

2.2.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides representan una clase muy diversa de metabolitos secundarios polifenólicos, que abundan en espermatofitos (plantas terrestres vasculares con semillas: gimnospermas y angiospermas),^{24,25} pero también se han informado de taxones primitivos, como las briofitas (plantas terrestres no vasculares, incluidas las hepáticas, los hornworts y los musgos), pteridofitas (plantas terrestres vasculares sin semillas, es decir, licófitas, cola de caballo y todos los helechos) y algas.^{26,27,28} En general, se han registrado alrededor de 10,000 flavonoides que representan el tercer grupo más grande de metabolitos secundarios después de los alcaloides (12,000) y los terpenoides (30,000).^{29,30}

Se ha informado de un número importante de fuentes naturales y sintéticas debido a sus diversas aplicaciones en las industrias farmacéuticas y dietéticas. Los flavonoides se producen especialmente en especies de plantas en flor, y los colores de las flores podrían ser indicativos de la clase de compuestos. Los flavonoides se obtienen principalmente como amarillo pálido, blanco, rojo, morado, azul, etc.³¹

2.2.2.1. CLASIFICACIÓN Y BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES

Los flavonoides se pueden clasificar según el origen biosintético. Los flavonoides se caracterizan por presentar 15 átomos de carbono en su esqueleto básico, dispuestos en la forma C6-C3-C6, que corresponde a dos anillos aromáticos A y B unidos por una unidad de tres átomos de carbono, que pueden o no dar lugar a un tercer anillo. Los anillos están etiquetados A, B y C (Figura 1) ^{32,33}. El paso inicial en la biosíntesis de la mayoría de los flavonoides deriva de la condensación de una molécula de p-coumaroil-CoA (derivada de shikimate, anillo B) con tres moléculas de malonil-CoA (origen policétido, anillo A) para dar calcona (2', 4', 6', 4-tetrahidroxicalcona). Esta reacción es llevada a cabo por la enzima chalcone sintasa (CHS). Chalcone se isomeriza posteriormente por la enzima chalcone flavanona isomerasa (CHI) a flavanona. De estos intermedios centrales, la vía diverge en varias ramas laterales, cada una de las cuales produce una clase diferente de flavonoides. ^{33,34,35}

Aunque la vía central para la biosíntesis de flavonoides se conservó en las plantas, dependiendo de la especie, un grupo de enzimas, como las isomerasas, reductasas, hidroxilasas, modifica el esqueleto flavonoide básico, lo que lleva a las diferentes clases de flavonoides ^{33,36}, incluidos los chalcones y flavanonas que son compuestos intermedios en la biosíntesis y productos finales presentes en varias partes de la planta. Las antocianinas, las proantocianidinas, las flavonas y los flavonoles son otras clases que solo se conocen como productos finales de la biosíntesis. La otra clase importante son los isoflavonoides, que se forman por reacción de migración

de la cadena lateral 2-arilo a la posición 3 mediada por la isoflavona sintasa.^{33,36}

Los flavonoides se producen naturalmente como compuestos asociados con el azúcar en formas conjugadas (glucósidos), sin azúcar unido como aglicones^{36,37}. A menudo están hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. Algunos de estos grupos hidroxilo son frecuentemente metilados, acetilados o sulfatados. La prenilación generalmente ocurre directamente en un átomo de carbono en los anillos aromáticos, pero también se ha encontrado la prenilación de O³⁸. Cuando se forma los glucósidos, el enlace glucosídico se ubica normalmente en la posición 3 o 7, y los carbohidratos son comúnmente L-ramnosa, D-glucosa, glucosa ramnosa, galactosa o arabinosa^{36,38}. Estos cambios a menudo alteran su solubilidad, reactividad y estabilidad. La mayoría de los flavonoides están presentes en forma de glucósidos en condiciones naturales³⁶.

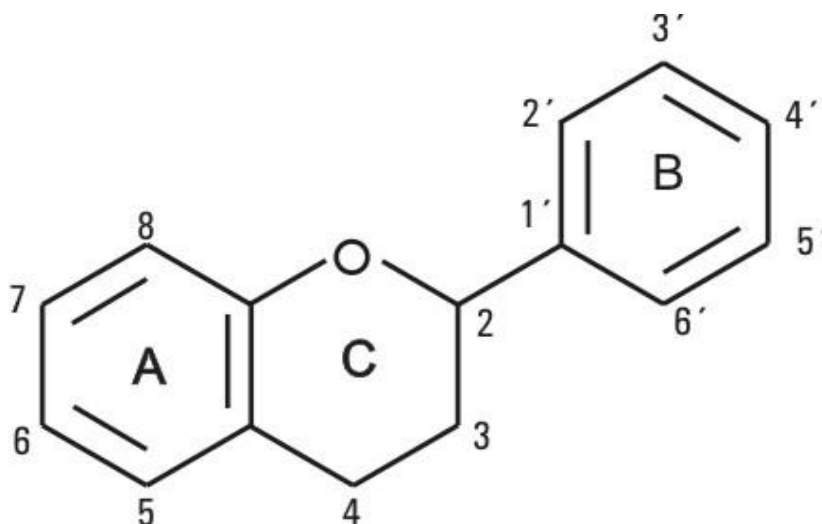


Figura 1. Estructura básica del esqueleto flavonólico y sistema de numeración.

Fuente: Pérez G.³⁹

2.2.2.2. Estructura química de los flavonoides

La naturaleza química de los flavonoides varía según el patrón de hidroxilación, la conjugación entre los anillos aromáticos, los restos glucosídicos, los grupos metoxi y otros sustituyentes. Los flavonoides contienen dobles enlaces y grupos conjugados (hidroxilo u otros sustituyentes) que pueden donar electrones mediante resonancia para estabilizar los radicales libres, que se originan en los espectros electrónicos de los flavonoides.^{40,41}

Los flavonoides tienen la capacidad de secuestrar radicales libres, son metabolitos con capacidad antioxidantes naturales derivados de plantas y se encuentran comúnmente en alimentos y bebidas ⁴². Las principales características estructurales de los flavonoides requeridas para la actividad antioxidante pueden determinarse por tres factores fundamentales: (1) una estructura 3', 4'-dihidroxi (catecol) en el anillo B favorece la deslocalización de electrones (A), (2) un insaturado el enlace 2-3 en conjugación con un grupo 4-ceto proporciona la deslocalización electrónica del anillo B (B) y (3) los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 forman enlaces de hidrógeno intramoleculares al grupo ceto (C). Estos efectos conducen al aumento de la eliminación de radicales por deslocalización de electrones o por donación de hidrógeno⁴³.

Los flavonoides tienen diferentes mecanismos de actividad, como la eliminación de radicales libres, la inactivación de peróxidos y otras especies reactivas de oxígeno, la quelación de metales y el enfriamiento rápido de productos secundarios de oxidación de lípidos. Las propiedades

de eliminación de radicales asociadas con la estructura de los flavonoides defienden contra el estrés oxidativo y al hacerlo reducen las enfermedades del corazón, previenen el cáncer y ralentizan los procesos de envejecimiento en las células responsables de las enfermedades degenerativas.^{42,43}

2.2.2.3.Métodos de extracción de flavonoides

El etanol y el metanol se usan con frecuencia para extraer flavonoides. Los métodos de extracción comunes incluyen inmersión, percolación, reflujo, reflujo continuo, etc. El alcohol de alta concentración (90–95%) se aplica para extraer flavonoides libres, y el alcohol a una concentración de aproximadamente 60% se aplica para extraer glucósidos flavonoides. El método de extracción con agua caliente se aplica a los glucósidos flavonoides. Posee las ventajas de bajo costo, seguridad, equipo simple y podría aplicarse en la producción industrial, pero muchas impurezas solubles en agua, como proteínas y sacáridos, podrían mezclarse en el producto.⁴⁴

2.2.2.4.Técnicas de aislamiento de flavonoides

2.2.2.4.1. preparación de la muestra

Los flavonoides, especialmente los de las plantas, se pueden extraer de varias partes, como raíces, cortezas, hojas, frutos y flores. Las muestras se secan y muelen con mayor frecuencia antes del proceso de extracción. Este tratamiento inicial de muestras ayuda a facilitar los rendimientos de extracción, así como a preservar los componentes. En

algunos casos, la extracción se lleva a cabo en materiales vegetales frescos. Se ha informado que, en varias investigaciones, los materiales vegetales secos contienen la mayoría de los flavonoides que las muestras frescas^{45,46,47}. Obviamente, las muestras molidas siempre dieron mayores rendimientos de extracción, y esto podría justificarse por el hecho de que el solvente tiene contacto con los constituyentes de la superficie cuando el polvo tiene partículas más pequeñas. Los rendimientos de extracción de flavonoides de los productos naturales también se ven afectados por algunos factores, como la temperatura, el tiempo y la proporción de agua en el caso de disolventes de mezcla acuosos⁴⁸.

Se han utilizado varios métodos para extraer flavonoides en materiales vegetales. Estos incluyen maceración, infusión, decocción, percolación, extracción continua en caliente (soxhlet), extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas, utilizando solventes como agua, etanol, metanol, n-butanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo, etc. Los solventes polares se utilizan para obtener glucósidos flavonoides, mientras que los solventes no polares extraen principalmente sus agliconas. La mayoría de las investigaciones realizadas en la extracción de flavonoides en materiales vegetales se han realizado por maceración e infusión^{47,49}.

2.2.2.4.2. Identificación y cuantificación de flavonoides

Hay numerosas técnicas que nos permiten cuantificar e identificar el contenido de flavonoides dentro de una muestra, entre ellos la

cromatografía. Esta técnica está basada en la separación de los distintos compuestos de una mezcla en función de la afinidad de cada compuesto por dos fases inmiscibles, una de las fases se considera la fase móvil, esta fase está en constante movimiento y la otra se considera la fase estacionaria, si los compuestos son más afines a la fase móvil avanzan con mayor rapidez mientras que aquellos que son afines a la fase estacionaria avanzan más lentamente, la fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede llegar a ser sólida o líquida⁵⁰. Debido a la estructura química de los flavonoides estos pueden identificarse y cuantificarse por cromatografía de capa fina (TLC) en este caso la fase estacionaria se encuentra en una placa plana y la fase móvil corre por capilaridad o por gravedad, o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión,^{51,52} además se pueden cuantificar por técnicas de espectrofotometría que se basan en un cambio de coloración, la técnica más utilizada es aquella que requiere tricloruro de aluminio en la cual se forma un complejo de inclusión de los flavonoides con el tricloruro.^{53,54}

2.2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los términos cromatografía líquida de alta resolución, de alta presión, de alta eficacia o cromatografía líquida moderna han ocurrido en el más sencillo, genérico, descriptivo y lógico de cromatografía líquida (LC, Liquid Chromatography).⁵⁵

La cromatografía de líquidos es el método de separación analítica más utilizada. Los motivos de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles.⁵⁶

2.2.3.1. Recipientes de fase móvil

Con la misión de albergar la fase móvil previamente a ser bombeada por la bomba del equipo, muchos cromatógrafos sin reservorios especiales disponen las fases móviles sobre los módulos del sistema en las mismas botellas donde vienen los disolventes o incluso matraces. Sin embargo, algunos reservorios instrumentales permiten ciertas importantes funciones “en línea”, viables también fuera del equipo: filtrar la fase móvil, la cual siempre debe filtrarse para evitar posibles obturaciones del sistema poniendo filtros en los reservorios, generalmente filtros de acero inoxidable de 0,2 P m en el extremo inicial de su tubo “de pesca”, que la llevará hasta el sistema de bombeo ; desgasificar, tarea obligada en sistemas de gradientes a baja presión, sobre todo en fase reversa, para asegurar una atmósfera inerte, más aún con fases móviles higroscópicas; termostatar, forzoso con fases móviles de bajo punto de ebullición o muy viscosas; desoxigenar, pues el oxígeno puede causar problemas en la detección electroquímica con fases móviles (y muestras) oxidables; agitar fases móviles resultantes de mezclar disolventes poco miscibles, disponiendo algunos reservorios de dispositivos agitadores o emplazando los reservorios sobre un agitador magnético externo.^{55,57,58}

Los recipientes se construyen con diversos materiales, siendo el vidrio (transparente o ámbar) el más utilizado. El plástico no es un material óptimo pues puede aportar partículas a la fase móvil.⁵⁵

2.2.3.2. Sistemas de bombeo

Entre los requisitos para las bombas en cromatografía de líquidos se encuentran:

- 1) la producción de presiones de hasta 6000 psi (lb /in.²) o 414 bares,
- 2) Libre salida de pulsos,
- 3) tasas de flujo de 0.1 a 10 mL /min,
- 4) reproducibilidad del flujo de 0.5% relativo o mejor y
- 5) componentes resistentes a la corrosión debido de la diversidad de solventes.

Debe resaltarse que las altas presiones producidas por las bombas de cromatografía de líquidos no presentan un riesgo de explosión, porque los líquidos no son muy compresibles. Por tanto, la ruptura de un componente del sistema sólo involucra pérdida de solvente. Lo que sí se puede evidenciar es que ésta puede representar un riesgo de incendio o de contaminación del ambiente.^{56,57}

2.2.3.3. Sistemas de inyección de muestra.

A menudo, el aspecto restrictivo en la precisión de las mediciones en cromatográficas líquidas es la reproductibilidad con la que se pueden agregar muestras en el relleno de la columna. El problema se enfatiza por el ensanchamiento de banda que acompaña al tapón o sobrecarga de

inyección. En consecuencia, los volúmenes de muestra utilizados tienen que ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro hasta quizá unos 500 μL . Además, lo adecuado es introducir la muestra sin despresurizar el sistema. El medio más usado para la introducción de las muestras en la cromatografía de líquidos se basa en los rizados de muestreo. Con frecuencia, estos dispositivos forman parte del equipo cromatográfico y hay rizados intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 1 hasta 100 μL o más. Con rizados de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi con una desviación estándar relativa de unas décimas porcentuales.^{58,59}

La mayor parte de los cromatógrafos actuales cuentan con autoinyectores. Dichas unidades tienen la capacidad de inyectar muestras en el cromatógrafo de líquidos a partir de frascos que están en un carrusel o desde placas microtituladoras. Por lo regular, contienen rizados de muestreo y una bomba de jeringa para inyectar volúmenes desde menos de 1 μL hasta más de 1 mL. Algunos poseen medios controlados por temperatura que facilitan el almacenamiento de la muestra y efectúan reacciones de derivación antes de inyectarla. La mayor parte de los equipos se puede programar para facilitar las inyecciones automáticas en el sistema de cromatografía de líquidos.⁵⁵

2.2.3.4. Columnas para cromatografía de líquidos de alta resolución.

La construcción para las columnas de esta técnica es ordinaria y con tubo de acero cromado con un diámetro interno uniforme. Las columnas para cromatografía líquida de alta resolución algunas ocasiones se fabrican con

tubos de vidrio de paredes resistentes o con polímeros como el polieter eter cetona. Además, también existen columnas de acero inoxidable cuyo interior está recubierto con vidrio o polieter eter cetona.^{55,56}

Columnas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) El gel de sílice se usa comúnmente como una fase estacionaria en la fase normal, HPLC de adsorción, y es el soporte para numerosas fases estacionarias unidas químicamente. La superficie de la sílice está cubierta con grupos de silanol fuertemente polares que interactúan con las moléculas en una fase móvil no polar, o sirven como sitios de reacción para la unión química. La HPLC de fase normal funciona bien con analitos que son insolubles en agua, y los solventes orgánicos de fase normal son más "amigables" con la MS que algunos de los tampones típicos utilizados en la HPLC de fase inversa. Sin embargo, la técnica a veces sufre de poca reproducibilidad de los tiempos de retención porque el agua o los solventes orgánicos próticos (que tienen un átomo de hidrógeno unido a un átomo de oxígeno o nitrógeno) cambian el estado de hidratación de la sílice. Este no es un problema para la HPLC de fase inversa, que se ha convertido en la técnica principal de HPLC. En los sistemas cromatográficos de fase inversa, las partículas de sílice se modifican químicamente para que sean no polares o hidrófobas, y la fase móvil es un líquido polar.^{55,61}

La mayoría de las columnas para cromatografía líquida miden de 5 a 25 cm de largo. Invariablemente se usan columnas rectas, las cuales se pueden alargar acoplando dos o más de ellas. La columna analítica cuenta con un diámetro interior de 3 a 5 mm; los tamaños de las partículas de los rellenos

más comunes son 3 o 5 μm . Las medidas de las columnas más utilizadas son de 10 a 15 cm de longitud, con 4.6 mm de diámetro interior y están rellenas con partículas de 5 μm . Este tipo de columnas generan de 40 000 a 70 000 platos /metro (por lo regular, alrededor de 10 000 platos /columna). Durante los años ochenta se fabricaron microcolumnas cuyos diámetros interiores oscilaban entre 1 y 4.6 mm y sus longitudes iban de 3 a 7.5 cm. Estas columnas, se rellenan con partículas de tamaño de 3 a 5 μm y alcanzan hasta 100 000 platos/metro, la principal ventaja que presenta es la rapidez y del mínimo consumo de solvente. Esta última propiedad es de mucha importancia, puesto que para cromatografía líquida se requiere solventes de alta pureza, los cuales son muy caros y se debe desechar luego de su uso.^{55,56}

2.2.3.5. Horno de columna

En muchas aplicaciones la temperatura no requiere un control riguroso, es por esa razón que las columnas trabajan a temperatura ambiente. Sin embargo, cuando la temperatura de la columna se mantiene constante muchas veces se obtienen mejores cromatogramas.

La temperatura influye en el factor de retención y afecta la resolución de una muestra. La temperatura también se usa como uno de los parámetros en el desarrollo del método. Los compartimentos de columna modernos tienen intercambiadores de calor solventes, que también calientan el solvente a la temperatura preestablecida. Para el desarrollo del método, se utilizan termostatos de columna basados en Peltier porque estos dispositivos pueden cambiar las temperaturas mucho más rápidamente y

porque la temperatura es uno de los parámetros que pueden variar cuando se desarrolla un método cromatográfico. Además, los termostatos de columna basados en Peltier no solo pueden calentar el solvente y el ambiente de una columna, sino también enfriar la columna o proporcionar una temperatura estable alrededor de una temperatura ambiente definida. A temperaturas más altas, la retención disminuye y es posible una elución más rápida. A temperaturas más bajas, la retención a menudo aumenta, especialmente en separaciones de fase inversa.^{56,61}

2.2.3.6. Detectores de HPLC

Pueden dividirse en detectores diferenciales, donde los analitos producen una señal “diferente” a la ocasionada en ellos por la fase móvil, y detectores integrales, que generan cromatogramas como una serie de escalones crecientes, que representan el valor acumulado aditivamente (integrado) de su señal frente al tiempo.^{55,58}

Los tipos de detectores más comunes se basan en absorción, fluorescencia, índice de refracción, dispersión de luz por evaporación y espectrometría de masas. Los tipos de detectores difieren en términos de sensibilidad, selectividad y rango lineal. La sensibilidad define la concentración más baja de un compuesto que se puede detectar. La selectividad determina cuán específico puede ser un detector para un determinado compuesto. El rango lineal describe el rango de concentración de un compuesto, en el cual el detector entrega una señal de respuesta lineal.^{55,61}

También distinguimos entre detectores destructivos y no destructivos. Los detectores de absorción UV, fluorescencia e índice de refracción no son

destruictivos. Los compuestos que pasan a través de la célula de detección permanecen intactos y pueden recuperarse. Por el contrario, los detectores basados en la dispersión de luz por evaporación y la espectrometría de masas son destructivos porque los compuestos se destruyen durante el proceso de detección. La base de la cuantificación en la fotometría de absorción UV es la Ley de Lambert-Beer.^{56,62}

Dos técnicas ópticas se implementan en detectores de absorción. Con la óptica directa, la luz de la longitud de onda de interés pasa a través de la celda de detección y un solo fotodiodo captura la luz emergente. Los detectores de absorción con óptica directa se denominan detectores de longitud de onda fija. Con la óptica inversa, la luz de todas las longitudes de onda de 190 a 600 nm pasa a través de la celda de flujo. La luz emergente se separa mediante una rejilla en sus longitudes de onda constituyentes y una serie de fotodiodos adquiere la información espectral resultante. Los detectores de absorción con óptica inversa y conjuntos de fotodiodos se denominan detectores de conjuntos de diodos. Los detectores de conjuntos de diodos no solo facilitan la detección en múltiples longitudes de onda, sino que también generan espectros UV para la identificación inequívoca de compuestos específicos.^{56,61}

Se implementan dos técnicas ópticas en los detectores de absorción. Con la óptica directa, la luz de la longitud de onda de interés pasa a través de la celda de detección y un solo fotodiodo captura la luz emergente. Los detectores de absorción con óptica directa se denominan detectores de longitud de onda fija. Con óptica invertida, la luz de todas las longitudes

de onda de 190 a 600 nm pasa a través de la celda de flujo. La luz emergente se separa mediante una rejilla en sus longitudes de onda constituyentes y una serie de fotodiodos adquiere la información espectral resultante. Los detectores de absorción con óptica inversa y conjuntos de fotodiodos se denominan detectores de conjuntos de diodos. Los detectores de matriz de diodos no solo facilitan la detección a múltiples longitudes de onda, sino que también generan espectros UV para la identificación inequívoca de compuestos específicos.^{56,62}

III. HIPÓTESIS

Hipótesis implícita

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de la investigación

El presente estudio es de tipo experimental.

G1-----01

G2-----02

G3-----03

Donde G1= Extracto metanólico de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.

Donde G2= Extracto acuoso (decocto) de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.

Donde G3= Extracto acuoso (infusión) de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.

4.2. Población y muestra

Población: Conjunto de flores de *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limetta* (lima) y *Prunus pérsica* (durazno).

Muestra: 1 Kg de cada flor de *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limetta* (lima) y *Prunus pérsica* (durazno).

4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	indicador
Contenido de flavonoides y ácidos fenólicos en las flores de <i>Citrus sinensis</i> (naranja), <i>Citrus limetta</i> (lima) y <i>Prunus pérsica</i> (durazno)	Los flavonoides y ácidos fenólicos son compuestos polihidroxilados, y que demuestran beneficios en la salud de los seres humanos	La cromatografía líquida de alta resolución HPLC, es la técnica analítica de separación para análisis cualitativo y cuantitativo con exactitud	<ul style="list-style-type: none"> • mg / g de muestra seca. • ug / g de muestra seca.
Los cromatogramas de los extractos de las flores de <i>Citrus sinensis</i> (naranja), <i>Citrus limetta</i> (lima) y <i>Prunus persica</i> (durazno)	El cromatograma es un registro gráfico bidimensional obtenido en un medio absorbente, que muestra la separación de	Se obtuvo el cromatograma de cada muestra registrándose el tiempo de retención y área bajo el pico	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de retención (minutos). • Área bajo el pico (mAU).

	sustancias mediante una cromatografía		
--	---	--	--

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

4.4.1. Recolección de la muestra

Las muestras de flores fueron recolectadas en el Distrito de Huaylillas, Provincia de Pataz, Departamento de la Libertad y trasladadas al laboratorio de investigación de farmacia y bioquímica – ULADECH Católica.

4.4.2. Preparación de la muestra

Se seleccionaron las flores en buen estado y se sometieron a secado en una estufa BINDER FD115 de convección forzada a 45°C por un lapso de 8 horas, luego se trituro hasta obtener un polvo fino.

4.4.3. Preparación del extracto metanólico

Se pesó 0.2555, 0.2573 y 0.2529 g de polvo fino de las flores naranja, lima y durazno respectivamente; por separado se colocaron dentro de un tubo de centrifuga de 50 mL, se añadió 15 mL de metanol al 80% + 0.1% ácido fórmico a cada uno de los tubos y se colocó en agitación constante sobre el agitador magnético durante 30 minutos, después se llevó a una centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320R a 6000 rpm a 4°C Durante 5 minutos, luego se separó el sobrenadante y se colocó en una fiola de 50 mL (envuelto con una capa de aluminio), este proceso de extracción se realizó 3 veces,

finalmente se lleva a volumen con el solvente y se conservó a -8°C hasta el momento del análisis.

4.4.4. Preparación de infusión.

Se pesó 1.0032, 1.0541 y 1.0526 g de polvo fino de las flores de naranja, lima y durazno respectivamente; cada una de ellas se colocó en vasos de precipitación de 250 mL (envueltos con una capa de aluminio), se agregó 200 mL de agua destilada hirviendo, tapamos y se dejó reposar por un lapso de 10 minutos, pasado este tiempo se filtró y se conservó a -8°C hasta el momento del análisis.

4.4.5. Preparación de decocto.

Se pesó 1.0923, 1.0864 y 1.0572 g de polvo fino de las flores de naranja, lima y durazno, se colocó en vasos de precipitación de 250 mL, a los cuales se agregó 200 mL de agua destilada, se llevó a una cocina hasta ebullición, dejamos en hervir por 5 min, retiramos de la cocina, filtramos y conservamos a -8°C hasta el momento del análisis.

4.4.6. Análisis por HPLC-DAD.

El análisis se llevó a cabo en un HPLC-DAD Hitachi Chromaster bajo las siguientes condiciones: Fase móvil C: Acetonitrilo + 0.1% Acido fórmico y D: Agua MilliQ + 0.1% Acido fórmico; Gradiente 0' : C 5%, D 95% 0' - 27' C 30%; D 70%, 27' - 28' : C 95%; D 5%, 28' - 30' : C 95%; D 5%.
Columna Chromolith® RP18, Flujo 0,8 mL/min, Temperatura de horno: 30°C , Detector 352 nm, Volumen de inyección 10 μL

4.5. PLAN DE ANÁLISIS.

El análisis se presenta a través de tablas y gráficos. Los resultados se muestran mediante cromatogramas y tabla de contenido de los flavonoides y ácidos fenólicos encontrados.

4.6. Matriz de consistencia

TITULO DE LA INVESTIGACION	FORMULACION DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLE	TIPO DE INVESTIGACION	METODOLOGIA
Determinación de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD en los extractos de las flores <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limetta</i> y <i>Prunus pérsica</i> .	¿Cuál es el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos en los extractos de las flores <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limetta</i> y <i>Prunus pérsica</i> ?	<p>Objetivo General</p> <p>Determinar el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD en los extractos de las flores <i>Citrus sinensis</i>, <i>Citrus limetta</i> y <i>Prunus pérsica</i>.</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>-Obtener el cromatograma de los extractos de las flores <i>Citrus sinensis</i>, <i>Citrus limetta</i> y <i>Prunus pérsica</i>.</p> <p>-Determinar la concentración de flavonoides y ácidos fenólicos en los extractos de las flores de <i>Citrus sinensis</i>, <i>Citrus limetta</i> y <i>Prunus pérsica</i>.</p>	implícita	Concentración de flavonoides y ácidos fenólicos en las flores de <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limetta</i> y <i>Prunus pérsica</i> .	Experimental	Determinación de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD

4.7. Principios éticos

Se promueve la memoria del uso ancestral de plantas en la actualidad para preservar la cultura del país, registrando así con el estudio, los datos relevantes, fortaleciendo desde lo científico las propiedades terapéuticas, causando impacto como fuente de nuevos medicamentos y otros beneficios para la humanidad. La finalidad es contribuir con la protección de la biodiversidad, puesto que es un bien común.

V. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS

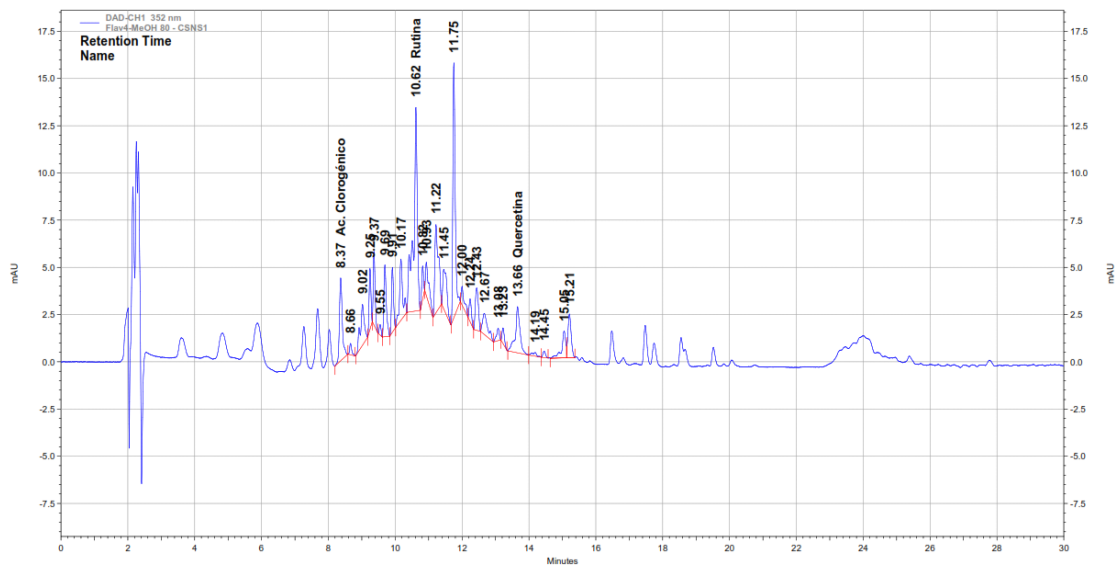


Gráfico 1: Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de los flore de Citrus sinensis (naranja).

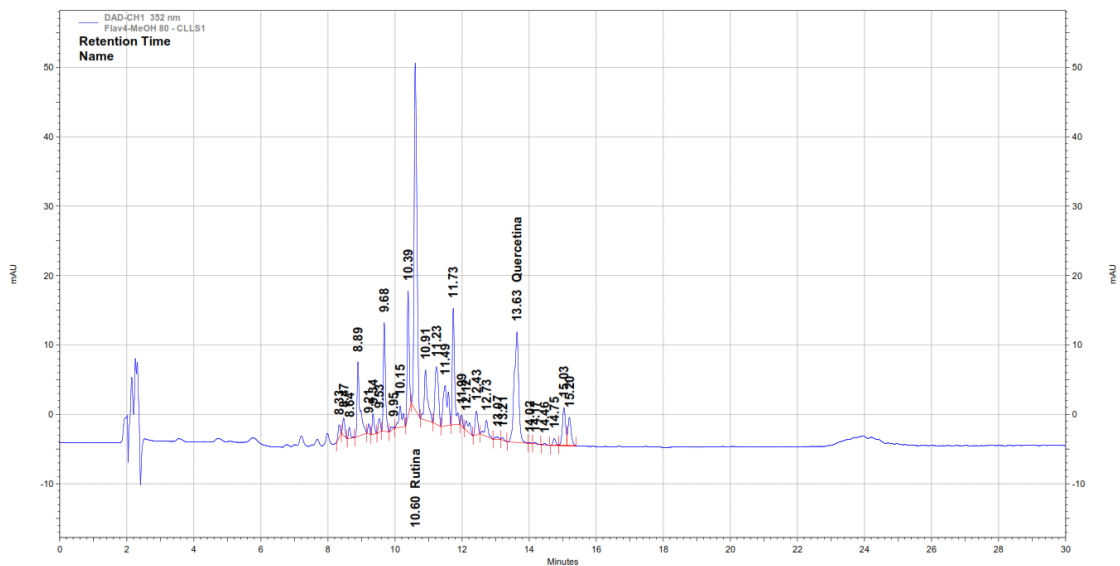


Gráfico 2: Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de los flore Citrus limetta (lima)

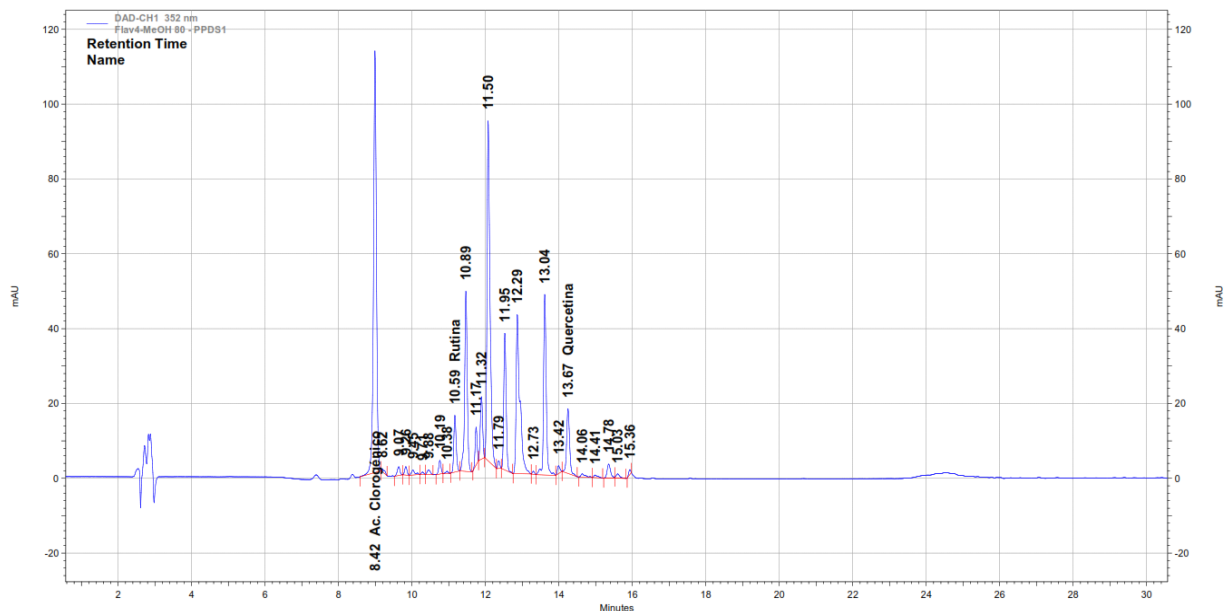


Grafico 3: Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de los flores de Prunus persica (Durazno)

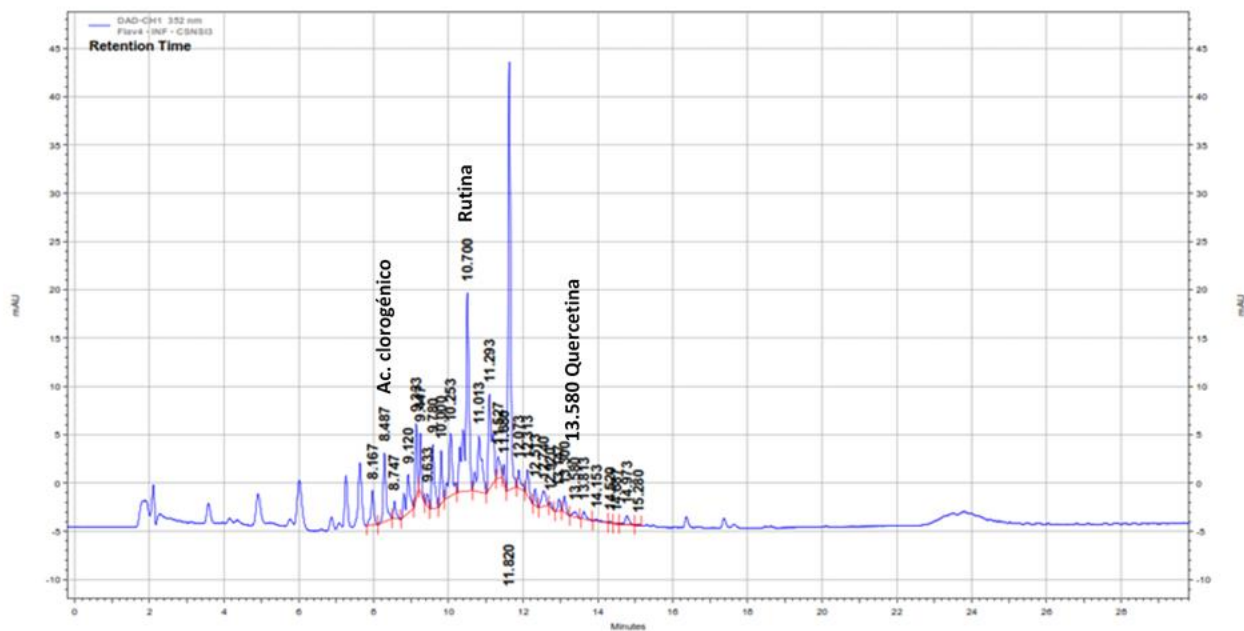


Grafico 4: Cromatograma correspondiente a infusión de las flores de citrus sinensis (Naranja)

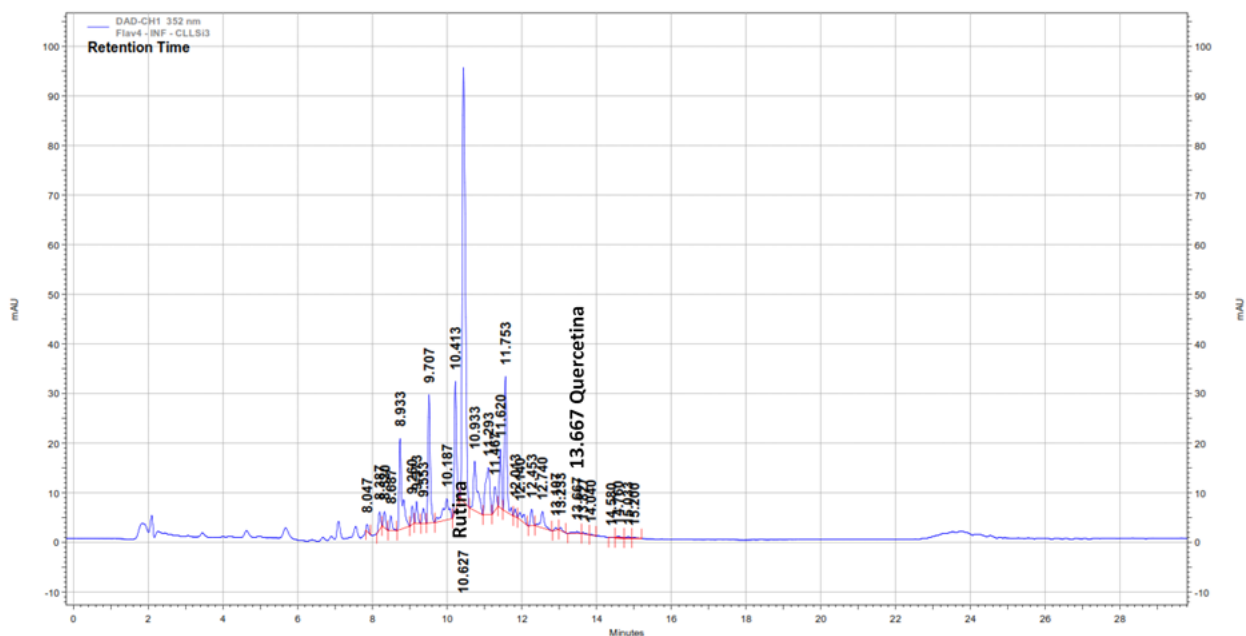


Grafico 5: Cromatograma correspondiente a infusión de las flores de citrus limetta

(Lima)

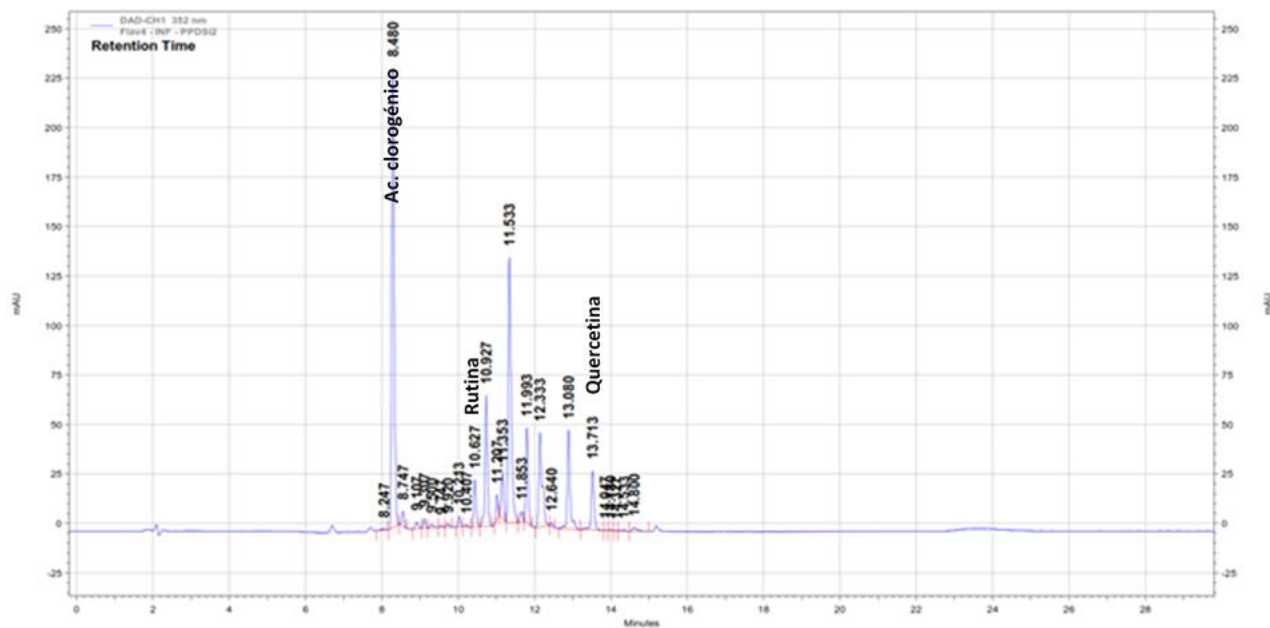


Grafico 6: Cromatograma correspondiente a infusión de las flores de Prunus persica

(Durazno)

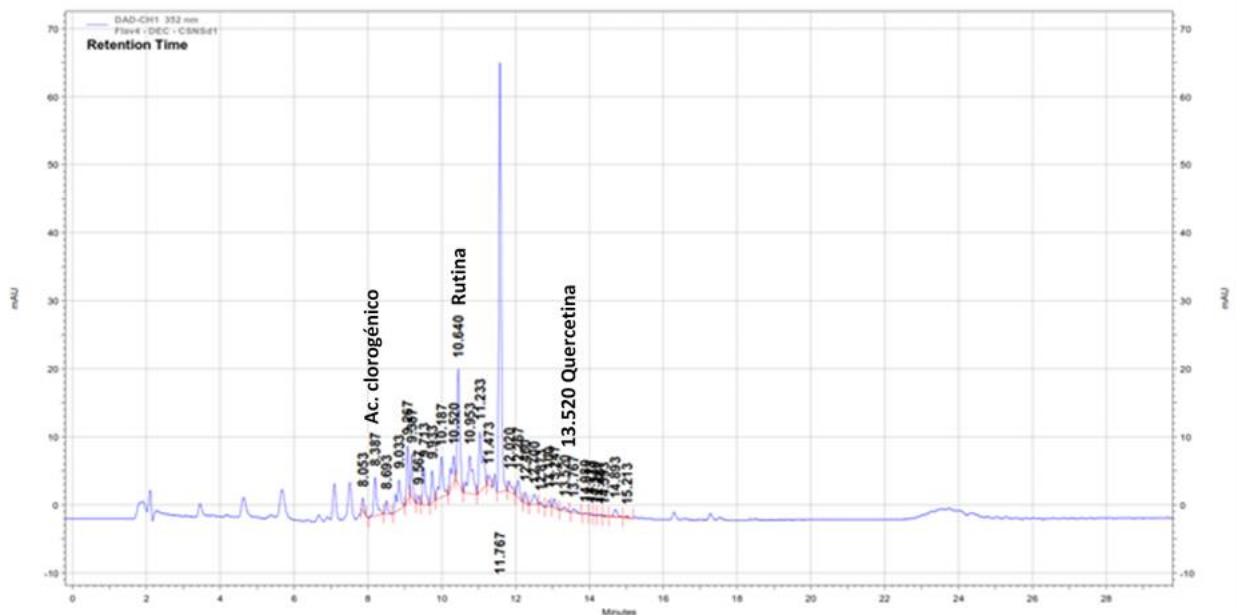


Grafico 7: Cromatograma correspondiente a decocto de las flores de Citrus sinensis (Naranja)

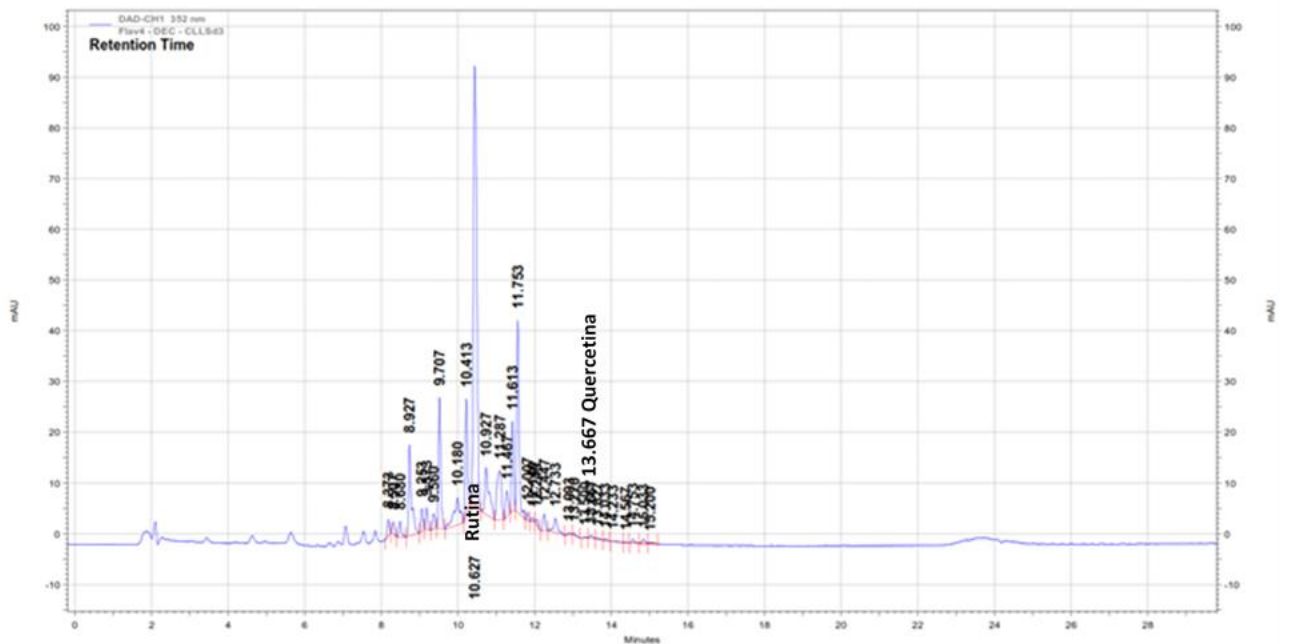


Grafico 8: Cromatograma correspondiente a decocto de las flores de Citrus limetta (Lima)

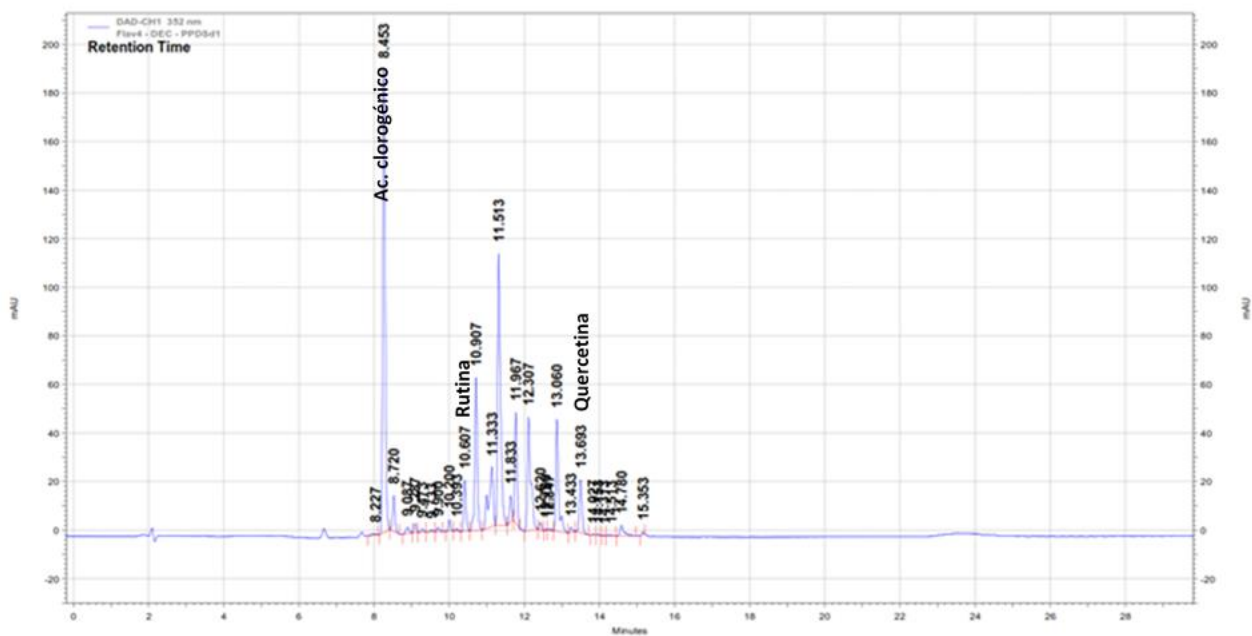


Grafico 9: Cromatograma correspondiente a decocto de las flores de Prunus persica (Durazno)

Tabla 01: Contenido de ácido clorogénico, rutina y quercetina mg y µg por gramo de muestra seca correspondiente al extracto metanólico y extracto acuoso (infusión y decocto) en las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.

Muestras	Ácido clorogénico mg/g de muestra seca	DS	Rutina mg/g de muestra seca	DS	Quercetina µg/g de muestra seca	DS
FCSN	2.46	0.01	2.65	0.00	507.29	10.09
FCSNi	2.74	0.29	3.03	0.56	355.41	1.67
FCSNd	2.51	0.01	2.45	0.00	320.21	5.90
FCLL	ND	ND	4.59	0.00	1576.81	5.65
FCLLi	ND	ND	6.69	0.15	318.72	11.48
FCLLd	ND	ND	6.59	0.01	610.61	11.20
FPPD	22.00	0.79	2.49	0.00	1162.95	2.61
FPPDi	33.79	0.03	2.72	0.00	1666.02	4.02
FPPDd	27.92	0.07	2.59	0.00	1234.94	2.76

ND: No detectado

FCSN: Extracto Metanólico de Flores de *Citrus sinensis*

FCSNi: Extracto acuoso (infusión) de Flores de *Citrus sinensis*

FCSNd: Extracto acuoso (decocto) de Flores de *Citrus sinensis*

FCLL: Extracto Metanólico de Flores de *Citrus limetta*

FCLLi: Extracto acuoso (infusión) de Flores de *Citrus limetta*

FCLLd: Extracto acuoso (decocto) de Flores de *Citrus limetta*

FPPD: Extracto Metanólico de Flores de *Prunus persica*

FPPDi: Extracto acuoso (infusión) de Flores de *Prunus persica*

FPPDd: Extracto acuoso (decocto) de Flores de *Prunus persica*

5.2. ANÁLISIS DERESULTADOS

En esta investigación se realizó la determinación de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD en las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*. el análisis se llevó a cabo en un HPLC-DAD Hitachi Chromaster con un Detector 352 nm y un Volumen de inyección 10 μ L. En el resultado se logran observar los picos, siendo identificado los picos de los flavonoides rutina y quercetina los cuales están presentes en las tres especies estudiadas, observando que el pico de rutina en *citrus sinensis* posee un tiempo de retención de 10.62 minutos, en *citrus limetta* un tiempo de 10.60 minutos y en *prunus pérsica* un tiempo de 10.59 minutos. Para el flavonoide quercetina el pico en *citrus sinensis* tiene un tiempo de retención de 13.66 minutos, en *citrus limetta* un tiempo de 13.63 minutos y en *prunus pérsica* un tiempo de 13.67 minutos. Por lo cual puede observar claramente que los tiempos de retención de cada uno de los flavonoides y especies están en un rango casi similar. Sin embargo, Varas D.⁶³ en su estudio de análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica de HPLC en el 2004. Donde uso un equipo HPLC Hewlett Packar 1100 Agiler, con un Detector UV-visible de 330 nm y un Volumen de inyección 50 μ L. Dando como resultado para el pico de rutina un tiempo de retención de 4.60 minutos y en el de quercetina un tiempo de 8.30 minutos. Se evidencia una gran diferencia en los tiempos de retención este estudio con el nuestro esto puede deberse a que se usó diferentes equipos con diferentes detectores y volúmenes de inyección.

Por otro lado, para la determinación de ácidos fenólicos se usó el mismo equipo HPLC-DAD Hitachi Chromaster con un Detector 352 nm y un Volumen de inyección 10 µL. Como resultado se obtuvo ácido clorogénico en dos de las tres plantas en estudio, en *Citrus sinensis* el pico conto con un tiempo de retención de 8.37 minutos y en *Prunus pérsica* un tiempo de 8.42 minutos. Por otro lado, Gómez M.⁶⁴ en su estudio Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudio de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos, realizado en Madrid 2015. Donde uso un equipo HPLC- DAD Agilent Serie 1200, su pico de ácido clorogénico tuvo un tiempo de retención de 8.30 minutos. En este caso se evidencia que los tiempos de retención son muy cercanos tanto en nuestro estudio como el de Gómez.

Tras el análisis de los picos de las diferentes flores, se procede a detallar por cantidades como se puede observar en la tabla 1, para ácido clorogénico se especifica la cantidad en miligramos por cada gramo de muestra seca, en las flores de *Citrus sinensis* en el extracto metanólico contiene 2.46 mg, en infusión 2.74 mg y en decocto 2.51 mg, siendo en la infusión la que presenta un mayor contenido de ácido clorogénico. En cuanto a las flores de *Prunus pérsica* el contenido en el extracto metanólico es de 22 mg, en infusión 33.79 mg y en decocto 27.92 mg, siendo la infusión que presento mayor contenido de ácido clorogénico seguido por el decocto, se puede evidenciar que *Prunus pérsica* tiene mayor contenido de ácido clorogénico tanto en el extracto metanólico, infusión y decocto. Para rutina se especifica la cantidad en miligramo por cada gramo de muestra seca, donde las flores de *Citrus sinensis* contiene en el extracto metanólico 2.65 mg, en infusión

3.03 mg y en decocto 2.45 mg, en las flores de *Citrus limetta* el contenido en el extracto metanólico es de 4.59 mg, en infusión 6.69 mg, y en decocto 6.59 mg y en las flores de *Prunus pérsica* el contenido en el extracto metanólico es de 2.49 mg, en infusión 2.72 mg y en decocto 2.59 mg, siendo la especie *Citrus limetta* la que presenta mayor contenido de rutina sobre las demás. Para quercetina se especifica la cantidad en microgramo por cada gramo de muestra seca, en las flores de *Citrus sinensis* el contenido en el extracto metanólico es de 507.29 µg, en infusión 355.41 µg y en decocto 320.21 µg, en las flores de *Citrus limetta* el contenido en el extracto metanólico es de 1576.81 µg, en infusión 318.72 µg y en decocto 610.61 µg, en cuanto a las flores de *Prunus pérsica* el contenido en el extracto metanólico es de 1162.95 µg, en infusión 1666.06 µg y en decocto 1234.94 µg, siendo *Prunus pérsica* la que presenta mayor contenido de quercetina, seguido por *citrus limetta* y finalmente *Citrus sinensis*.

En el estudio de determinación de flavonoides en las flores *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica* mostraron la presencia de los flavonoides rutina y quercetina. El flavonoide quercetina ha demostrado la inhibición del ADN polimerasa II, las tiroxinas quinasas, la bomba de calcio la fosfodiesterasa, entre otras. Estas acciones le atribuyen diversos efectos farmacológicos como antiinflamatorios, analgésicos, antimutagenicos y antioxidantes.⁶⁵ La rutina, ha demostrado incrementar la actividad enzimática del glutatión peroxidasa, es por esto que se le atribuye efectos como antioxidantes, antiulcerosos y la prevención de la peroxidación lipídica, además previne la aterosclerosis ya que inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.⁶⁶

Para la determinación de ácidos fenólicos en las flores de *Citrus sinensis* y *Prunus pérsica* se logró obtener ácido clorogénico, estudios in vitro han demostrado que el ácido clorogénico, inhibe la reacción N-nitrosación, logrando así disminuir la formación de compuestos de N-nitroso los cuales son potencialmente carcinogénicos y mutagénicos, por otro lado también podría disminuir el daño del ADN, además parece reducir la absorción intestinal de glucosa por ello podría reducir el riesgo de padecer diabetes hasta un 30% al activar la acción de mejorar la tolerancia a la glucosa.^{67,68}

La determinación de flavonoides y ácidos fenólicos en estas especies vegetales lleva a señalar que estas podrían ser usadas para más estudios y el descubrimiento de tratar otras enfermedades a las señaladas.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó el contenido de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC-DAD en los extractos de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*, encontrándose cantidades considerables tanto de flavonoides y ácidos fenólicos, generando un interés para continuar con la investigación.
- Se obtuvo los cronogramas tanto de rutina, quercetina y ácido clorogénico de los extractos de las flores *Citrus sinensis*, *Citrus limetta* y *Prunus pérsica*.
- En flavonoides se logró identificar rutina la concentración en *Citrus sinensis* extracto metanólico fue 2.65 mg, infusión 3.03 mg, decocto 2.45mg, en *Citrus limetta* extracto metanólico 4.59 mg, infusión 6.69 mg y decocto 6.59 mg y en *Prunus pérsica* extracto metanólico 2.49 mg, infusión 2.72 mg y decocto 2.59 mg/g de muestra seca y para quercetina en *Citrus sinensis* extracto metanólico 507.29 µg, infusión 355.41 µg, decocto 320.21 µg, en *Citrus limetta* extracto metanólico 1576.81 µg, infusión 318.72 µg, decocto 610.61 µg, y en *Prunus pérsica* extracto metanólico 1162.95 µg, infusión 1666.02 µg y decocto 1234.94 µg/g de muestra seca y en cuanto a ácidos fenólicos se logró encontrar el ácido clorogénico el contenido en las flores de *Citrus sinensis* en el extracto metanólico fue 2.46 mg, infusión 2.74 mg y decocto 2.51 mg, en *Prunus pérsica* en extracto metanólico 22 mg, infusión 33.79 mg y decocto 27.92 mg/g de muestra seca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pacheco A. la medicina natural en la salud. [Libro]. Estados unidos : Palibrio; 2013
[citado el 03 de Agosto de 2019]: Disponible en:
<https://books.google.com.pe/books?id=jcFbklf671kC&printsec=frontcover&dq=la+medicina+natural&hl=es-#v=onepage&q=la%20medicina%20natural&f=false>
2. Organización mundial de la salud. Pautas Generales para las Metodologías de Investigación y Evaluación de Medicina Tradicional. [PDF]. Ginebra, Suiza: 2000.
[Citado el 03 de abril de 2019]. Disponible en:
<http://www.ops.org.bo/textocompleto/pi31763.pdf>
3. Merino MH. Contribución al conocimiento etnobotánica en San Luis La Herradura, Departamento de La Paz, El Salvador. [Tesis]. Universidad de El Salvador, El Salvador; 1998. [Citado el 03 de abril de 2019]. Disponible en:
<http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/18223>
4. OMS. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional. 2014-2023. [PDF] Ginebra, Suiza: 2013. [Citado el 03 de Abril de 2019]. Disponible en:
<https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
5. Cook N, Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources [Revista]. University of sydney; Australia: 2004
[Quoted on August 03, 2019]: 7(2): 66-76. Available at:
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
6. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity [Articulo]. New England Medical Center Hospital & Jean Mayer Human Nutrition

- Center on Aging at Tufts University; Boston: 1999 [Quoted on August 03, 2019]: 18(12): 1995-2018. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(98\)00169-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00169-9)
7. Grotewold E. The Science of Flavonoids. [Libro] Ed. Erich Grotewold: USA: 2008. [Quoted on August 03, 2019] Available at: <https://books.google.com.pe/books?id=B3yb7TNwsa0C&pg=PA50&dq=flavonoids&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjMsbTQ7pXmAhXuzVkKHQitA98Q6AEITjAE#v=onepage&q=flavonoids&f=false>
 8. Tepe B, Sokmen A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. *Bioresource Technol.*2007;(98):3076-3079. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.019>
 9. Treutter D, Wang D, Farag M, Baires G, Rühmann S, Neumüller M. Diversity of phenolic profiles in the fruit skin of *Prunus domestica* plums and related species. [Revista] *J. Agric. Food Chem.* 2012 [Citado el 26 de agosto del 2019]; 60: 12011–12019. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf303644f>
 10. Venter A, Joubert E, De Beer D. Characterisation of Phenolic Compounds in South African Plum Fruits (*Prunus salicina* Lindl.) using HPLC Coupled with Diode-Array, Fluorescence, Mass Spectrometry and On-Line Antioxidant Detection. [Artículo]. April 2013. [Citado el 26 de agosto del 2019]; 18 (5): 5072-5090. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules18055072>
 11. Tenorio M. Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). [Revista]. Perú; Universidad Nacional

- de Trujillo: 2016. [Citado el 27 de agosto del 2019]. 7(4):419-431. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357649703007.pdf>
12. Damián A, González J, Maya R, Cortés C, Chávez M. Polyphenolic content and bactericidal effect of Mexican Citrus limetta and Citrus reticulata. Journal of food science and technology. [Artículo] January 2017.[Citado el 27 de agosto del 2019]: 54(2), 531–537. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2498-7>
13. Estrada N. “Exploración de las interacciones fisicoquímicas de los flavonoides-matriz en un producto de lima (Citrus limetta)y/o naranjaagria (Citrus aurantium)y su efecto en las propiedades hipoglucemiantes e hipocolesterolémicas en modelo animal”. [Tesis]. Guadalajara; Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C: 2015. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/379/1/Nancy%20Abril%20Estrada%20Sierra.pdf>
14. Peterson J, et al. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature [Artículo]. USA; Tufts University Friedman School of Nutrition Science & Policy: 2006 [Citado el 27 de Agosto del 2019]; 19(1):74-80. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.009>
15. U.S. National plant Germplasm System. Taxon: Citrus sinensis [Internet] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. [Citado el 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=10782>

16. Ponz E. La medicina tradicional de los tacana y machineri: conocimientos prácticos de las plantas medicinales. [Libro] Bolivia; Ed. Amazon: 2005. [Citado el 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=3XCnbg0o3doC&pg=PA95&dq=DESCRIPCION+BOTANICA+DE+CITRUS+SINENSIS&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjUrY2arYPjAhVyvFkKHfosD60Q6AEIKDAA#v=onepage&q&f=false>
17. Germosen L. Farmacopea Vegetal [Libro]. 2 edición: 2010. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://issuu.com/scduag/docs/farmacopea2/247>
18. León J. Botánica de los cultivos tropicales [Libro] Tercera edición. Costa Rica; ED. Amazon: 2010. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=NBtu79LJ4h4C&pg=PA295&dq=DESCRIPCION+BOTANICA+DE+CITRUS+SINENSIS&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjUrY2arYPjAhVyvFkKHfosD60Q6AEILTAB#v=onepage&q&f=false>
19. Abdullah A, Mahmood T, Siddiqui H, Akhtar J. Phytochemical and pharmacological properties on Citrus limetta (Mosambi). [Artículo] 2016. [Citado el 27 de agosto del 2019]; 83: 555-563. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/299536530_Phytochemical_and_pharmacological_properties_on_Citrus_limetta_Mosambi
20. USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. Taxon: Citrus sinensi: 2019. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=10782>

21. Gil G. Fruticultura - El potencial productivo: Crecimiento vegetativo y diseño de huertos y viñedos [Libro]. Cuarta edición; Chile: 1997. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=wetTDwAAQBAJ&pg=PP29&dq=origen+de+prunus+persica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjH0e_Pnd71AhUtvIkKHaHCBcUQ6AEINjAC#v=onepage&q=origen%20de%20prunus%20persica&f=false
22. Box M. Prontuario de agricultura [Libro] Mexico; Ed. Mundi: 2005. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=Glts8S4zuWAC&pg=PA730&dq=Prunus+persica+taxonomia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjol9O5-JbVAhXLZiYKHTPSCaYQ6AEIITAA#v=onepage&q=Prunus%20persica&f=false>
23. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Guia tecnica del cultivo del melocotón [Libro]. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=QFKs3WPU3NEC&pg=PA4&dq=origen+de+prunus+persica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjH0e_Pnd71AhUtvIkKHaHCBcUQ6AEIPTAD#v=onepage&q=origen%20de%20prunus%20persica&f=false
24. Martens S, Preuss A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonols and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. [Articulo]. [Citado el 27 de agosto del 2019]. 2010; 71:1040-1049. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.016>
25. Oh H, Kim D, Cho J, Kim Y. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins, flavonoids isolated from *Equisetum arvense*.

- [Artículo]. *Journal of Ethnopharmacology*: 2004 [Citado el 27 de agosto del 2019]; 95(3):421-424. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.015>
26. Imperato, F. A new flavonoid glycoside from the fern *Dryopteris villarii*. [Artículo]. *Natural Product Communications*: 2008. [Citado el 27 de agosto del 2019]; 3:1709-1712. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1934578X0800301026>
27. Vassao D, Kim K, Davin L, Lewis N. Lignans (neolignans) and allyl/propenyl phenols: biogenesis, structural biology, and biological/human health considerations. [Artículo] 1st ed. In: Mander L, Liu H-WB, editors. *Comprehensive natural products II* Oxford: 2010 [Citado el 27 de agosto del 2019] pp. 815-928. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00001-0>
28. Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. [Artículo]. *Journal of Plant Research*. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 2000; 113:287-299. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/PL00013940>
29. Feld H, Zapp J, Becker H. Secondary metabolites from liverwort *Tylimanthus renifolius*. [Artículo] *Phytochemistry*. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 2003; 64:1335-1340. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.021>
30. Dixon R, Pasinetti G. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. [Artículo] *Plant Physiology*. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 2010; 154:453-457. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.110.161430>
31. Maurice D. Awouafack, Pierre T, Hiroyuki M. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids, *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*, Goncalo C. Justino, IntechOpen. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/67881>

32. Ferreyra F, Rius S, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. [Artículo]. Argentina; Universidad Nacional de Rosario: *Frontiers in Plant Science*. [Citado el 27 de agosto del 2019]. 2012; 3:1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
33. Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. [Artículo]. 2014. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 19(10):16240-16265. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270724/>
34. Alzand K, Mohamed M. Flavonoids: chemistry, biochemistry and antioxidant activity. [Artículo]. *Journal of Pharmacy Research*: 2012. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 5(8):4013-4020. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Kutaiba_Alzand2/publication/320957444_Flavonoids_Chemistry_Biochemistry_and_Antioxidant_activity/links/5a045edc4585151f47948a0b/Flavonoids-Chemistry-Biochemistry-and-Antioxidant-activity.pdf
35. Koes R, Quattrocchio F, Mol J. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. [Artículo]. *BioEssays*: 1994. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 16(2):123-132. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bies.950160209>
36. Martens S, Preuss A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonols and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. [Revista]. *Phytochemistry*: 2010. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 71(10):1040-1049. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.016>
37. Fossen T, Andersen M. Spectroscopic techniques applied to flavonoids. [Artículo] Primera edición: New York; Editors. In: Andersen OM, Markham KR: 2006.

- [Citado el 27 de agosto del 2019] pp. 100-118. Disponible en:
<https://content.taylorfrancis.com/books/download?dac=C2009-0-04676-8&isbn=9781420039443&format=googlePreviewPdf>
38. Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. [Revista]. *Pharmacology & Therapeutics*: 2002. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 96(3):67-202. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
39. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. [Revista]. *Rev Cubana Invest Bioméd.* [Citado el 27 de agosto del 2019]. 22 (1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007
40. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. [Revista]. *Journal of Nutritional Biochemistry*: 2002. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 13(10):572-584. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
41. Eugster C, Marki E. The chemistry of rose pigments. [Artículo]. 1991. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 30(6):654-672. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/anie.199106541>
42. Gupta J, Gupta A, Gupta AK. Flavonoids: its working mechanism and various protective roles. [Artículo]. India; *International Journal of Chemical Studies*: 2016. [Citado el 27 de agosto del 2019]: 4(4):190-198. Disponible en: <http://www.chemjournal.com/archives/2016/vol4issue4/PartC/4-4-18-287.pdf>
43. Croft K. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. [Artículo]. New York; *Academy of Sciences*: 1998. [Citado el 27 de agosto del

- 2019];854(1):435-442. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
44. Weisheng F, Zhiyou H, Meng L. Isolation and Structure Identification of Flavonoids, Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health, Goncalo C. [Libro] 2017. [Citado el 27 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/isolation-and-structure-identification-of-flavonoids>
45. Rabeta M, Lin S. Effects of different drying methods on the antioxidant activities of leaves and berries of Cayratia trifolia. [Articulo]. Sains Malaysiana:2015. [Citado el 27 de agosto del 2019]. 44(2):275-280. Disponible en: http://journalarticle.ukm.my/8313/1/16_M.S._Rabeta_.pdf
46. Vaidya B, Brearley T, Joshee N. Antioxidant capacity of fresh and dry leaf extracts of sixteen Scutellaria species. [Revista]. Journal of Medicinally Active Plants: 2014. [Citado el 27 de agosto del 2019]; 2(3):42-49. Disponible en: <https://doi.org/10.7275/R5J9649K>
47. Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Gritsanapan W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. [Revista]. Industrial Crops and Products: 2013. [Citado el 07 de setiembre del 2019]; 44:566-571. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
48. Tan S, Parks S, Stathopoulos C, Roach P. Extraction of flavonoids from bitter melon. [Articulo]. Food and Nutrition Sciences: 2014. [Citado el 07 de setiembre del 2019]; 5(5):458-465. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.55054>

49. Munhoz V, Longhini R, Souza J, Zequi J, Mello E, Lopes G, Mello J. Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: process optimization and screening for biological activity. [Reviasta]. Brasil; Revista Brasileira De Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy: 2014. [Citado el 07 de setiembre del 2019]; 24(5):576-583. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.001>
50. Reich E y Schibli A. Introduction. High-Performance Thin-Layer Cromatography for the Analysis of Medicinal Plants. [Libro]. New York: 2006. [Consultado el 07 de setiembre del 2019]. pp. 264.
51. Roowi S, Crozier A. Flavonoids in tropical citrus species. [Revista]. Journal of agricultural and food chemistry: 2011. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 59(22): 12217-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978223>
52. Saeidi I, Hadjmohammadi M, Peyrovi M, Iranshahi M, Barfi B, Babaei A, Dust A. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. [Revista] Journal of pharmaceutical and biomedical analysis: 2011. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 56(2): 19-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683540>
53. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. [Revista]. Food Chemistry: 2010. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 120(2): 599-606. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609012230>
54. Mammen D, Daniel M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. [Reviasta]. Food

- chemistry: 2012. [Citado el 18 de octubre del 2019]: 135(3): 1365-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953867>
55. García A, Marco, Dolores J. HPLC instrumental. [Libro] Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia: 2016. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=4721923>.
56. Douglas A, James F, Crouch S. Principios de análisis instrumental. [Libro]. 6a ed. Mexico: Cengage Learning; 2008. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://idoc.pub/documents/skoog-holler-crouch-principios-de-analisis-instrumental-6ta-edpdf-d49oyddex149>
57. Dong M. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. [Libro] Segunda edicion; USA: 2019. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=Ub-cDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=hplc+analytical+fundamentals+basic&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiR_M_Ivvz1AhXkK7kGHbXqARoQ6AEIezAI#v=onepage&q=hplc%20analytical%20fundamentals%20basic&f=false
58. Dong M. Modern HPLC for Practicing Scientists. [Libro]. Canada; Ed. Amazon: 2006. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=RYOHFneTy-UC&printsec=frontcover&dq=hplc+analytical+fundamentals+basic&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjs44Hcvz1AhUaGrkGHa2wD2M4ChDoAQgnMAA#v=onepage&q=hplc%20analytical%20fundamentals%20basic&f=false>

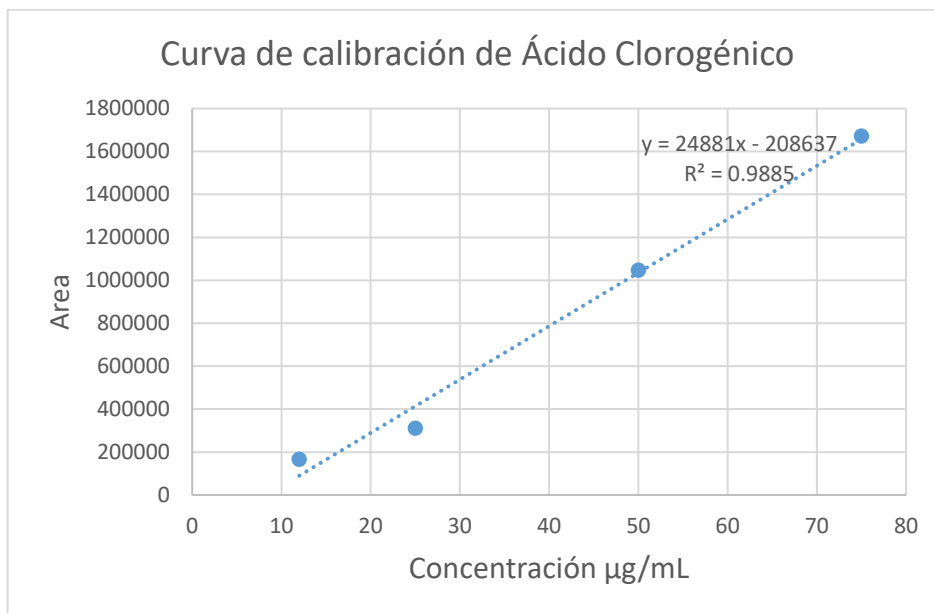
59. Heftmann E. Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography. [Libro] 6th edicion: San Diego: 2004. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=BOlzy9W6l6oC&printsec=frontcover&dq=hplc+analytical+fundamentals+basic&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjs44HcvvzIAhUaGrkGHa2wD2M4ChDoAQg6MAI#v=onepage&q=hplc%20analytical%20fundamentals%20basic&f=false>
60. Corradini D, Eksteen E, Eksteen R, Schoenmakers P, Miller N. Handbook of HPLC. [Libro] Madrid; Ed Amazon: 1998. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=4mj_DArD5n0C&pg=PR3&dq=hplc+analytical+fundamentals+basic&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjs44HcvvzIAhUaGrkGHa2wD2M4ChDoAQhDMAM#v=onepage&q=hplc%20analytical%20fundamentals%20basic&f=false
61. Agilent Technologies. The LCHandbookGuide to LC Columns and Method Development [Internet]. USA: 2016. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
62. Ahuja S, Dong M. handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. [Libro]. London; Ed ELSEVIER: 2005. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://www.sohailuniversity.edu.pk/wp-content/uploads/2018/12/Handbook-of-Pharmaceutical-Analysis-by-HPLC.pdf>

63. Varas D. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC. [Tesis]. Chile; Universidad austral de Chile: 2004. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fcv288a/pdf/fcv288a.pdf>
64. Gonzales M. Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos. [Tesis]. Madrid; UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID: 2015. [Citado el 18 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/33529/1/T36516.pdf>
65. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca J, Flamm G, Williams G, Lines T. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. [Revista]. Food and Chemical Toxicology: 2007. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 45(11): 2179–2205. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.015>
66. La Casa C, Villegas I, Alarcón C, Motilva V, Martín M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. [Revista]. Journal of Ethnopharmacology: 2000. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 71(2): 45–53. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(99\)00174-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00174-9)
67. Yagasaki K, Miura Y, Okauchi R, Furuse T. Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture. [Revista]. Cytotechnology: 2000. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 33(3): 229–235. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1008141918852>

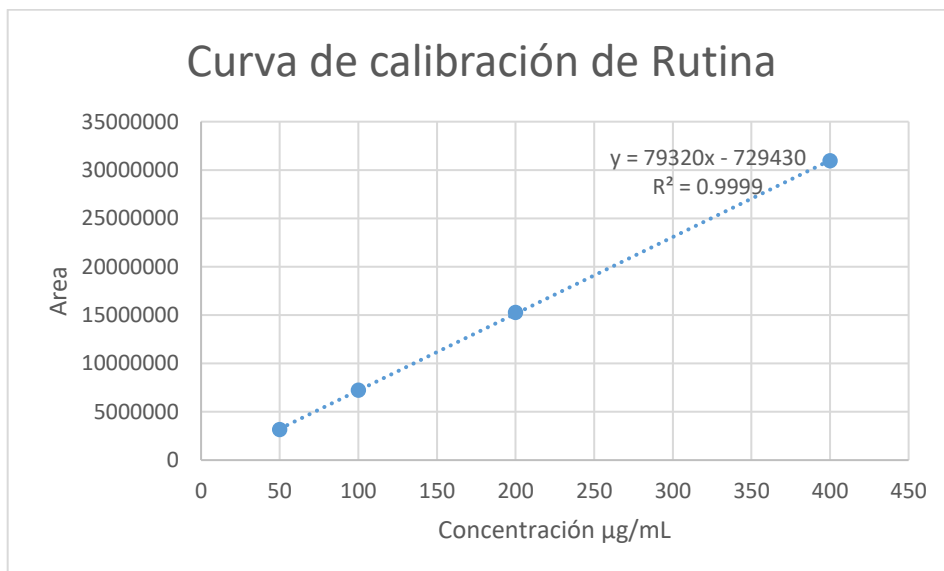
68. Olthof M, Hollman P, Katan M. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. [Artículo]. The Journal of Nutrition: 2001. [Citado el 18 de octubre del 2019]; 131(1): 66-71. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jn/131.1.66>

Anexos

Curva de calibración de ácido clorogénico



Curva de calibración de rutina



Curva de calibración de quercetina

