



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

**IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS DE NATURALEZA FLAVÓNICA  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA UV-VIS A PARTIR DE ESTÁNDARES DE  
FLAVONOIDES. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA A UN EXTRACTO  
VEGETAL COMERCIAL**

Unidad de investigación para optar al título de Químico Farmacéutico

**Autor:**

**Javiera Gaete Pérez**

Director:

Maite Rodríguez Díaz

Co-Director:

Lorena Sáez Lancien

Viña del Mar, Chile

2018



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

**IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS DE NATURALEZA FLAVÓNICA  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA UV-VIS A PARTIR DE ESTÁNDARES DE  
FLAVONOIDES. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA A UN EXTRACTO  
VEGETAL COMERCIAL**

**Autor:**

**Javiera Gaete Pérez**

Comisión Correctora:

Rodrigo Díaz Vicedo

Daniela Irarrázabal Verdugo

Viña del Mar, Chile

2018

## **DIRECTOR**

**Dra. Maité Rodríguez Díaz**, Químico Farmacéutico Universidad Central de Las Villas (UCLV), Santa Clara, Cuba. Magíster en Química Farmacéutica, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana. Doctor en Ciencias Mención Química, Universidad de Chile. Profesora de Botánica y Farmacognosia, Farmacoquímica I y II, Universidad Andrés Bello.

## **CO-DIRECTOR**

**QF. Lorena Sáez Lancien**, Directora de Carrera Química y Farmacia Universidad Andrés Bello, sede Viña del Mar. Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Diplomado en Docencia Universitaria, Universidad Andrés Bello. Magíster en Administración de Empresas (MBA) Universidad del Desarrollo. Profesora de Introducción a las Ciencias Farmacéuticas. Profesora de Tecnología Farmacéutica y Tecnología Cosmética, Universidad Andrés Bello.

## **COMISIÓN CORRECTORA**

**Dr. Rodrigo Díaz Viciedo**, Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso. Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Complutense de Madrid. Director del Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Universidad de Valparaíso. Profesor de Farmacognosia, Universidad de Valparaíso. Profesora de Botánica y Farmacognosia, Universidad Andrés Bello.

## **QF. Daniela Irrázabal Verdugo**

Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso. Jefe del Departamento Técnico, Farmacopea Chilena. Profesora de Botánica y Farmacognosia, Universidad Andrés Bello.

*“Dedicado a mis padres Teresa Pérez y Enrique Gaete, por el apoyo incondicional y la fuerza entregada para cumplir metas”*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Primero que todo, agradezco a la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad Andrés Bello por impulsarme a lograr una de mis mayores y más anheladas metas, forjándome un futuro como profesional.*

*A Dra. Maite Rodríguez, por su compromiso, excelente dirección y apoyo continuo; por sus numerosas enseñanzas, tanto en el ámbito profesional como en la vida misma. Siempre estaré agradecida la confianza en mi trabajo, su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, al igual que su tiempo.*

*A QF. Lorena Sáez, por todo lo entregado y creer en mí; por su gran apoyo durante todo este período; por facilitarme los Laboratorios de la carrera de Química y Farmacia para el desarrollo de esta tesis y por todo el tiempo dedicado para dicho propósito.*

*A Carolina Vera, por su disposición y paciencia en la ayuda y colaboración de cualquier necesidad en el laboratorio para el desarrollo de este estudio.*

*A Elizabeth Tapia, por su amistad de larga data, apoyo y consejos que fueron fundamentales durante este período.*

*A Carol Gallegos, por los consejos y motivación en los momentos difíciles; por su amistad que contribuyó enormemente en los cambios de mi vida.*

*A Andrés, por su ayuda, comprensión y contención durante todos los momentos de este tiempo.*

*Pero sobre todo y por encima de todo, quiero agradecer a mi familia todo el apoyo incondicional que me han dado, por hacerme sonreír en los momentos más difíciles, por enseñarme que la vida está llena de colores y mostrarme alternativas, por ser mis compañeros de viaje, ya que sin su apoyo este trabajo nunca hubiese llegado a su fin.*

*Muchas gracias a todos.*

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 FLAVONOIDES.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Estructura química de los flavonoides .....	6
1.1.2 Biosíntesis flavonoides .....	9
<b>1.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS FLAVONOIDES.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Capacidad antioxidante .....	10
1.2.2 Efectos farmacológicos.....	13
1.2.3 Flavonoides como principios activos de fitofármacos.....	16
<b>1.3 IDENTIFICACIÓN ANALÍTICA DE FLAVONOIDES.....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Espectrometría UV .....	18
1.3.2 Comportamiento del espectro UV-Vis con reactivos de desplazamiento.....	21
<b>1.4 EJEMPLOS DE FLAVONOIDES CON INTERÉS FARMACÉUTICO.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Quercetina .....	22
1.4.2 Apigenina.....	23
1.4.3 Hesperidina .....	24
1.4.4 Genisteína .....	25
1.4.5 Catequina .....	25
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Objetivo general.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Reactivos, equipos y materiales .....</b>	<b>32</b>
4.1.1 Reactivos.....	32
4.1.2 Materiales y Equipos .....	32
4.1.3 Preparación de Reactivos.....	33
<b>4.2 Cuantificación e identificación de flavonoides totales.....</b>	<b>37</b>
4.2.1 Determinación de flavonoides totales .....	37
4.2.2 Identificación de flavonoides.....	41

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 Cuantificación de flavonoides totales.....</b>	<b>44</b>
5.1.1 Obtención de las Gráficas estándar flavonoides en etanol.....	44
5.1.2 Obtención de las Gráfica curva estándar flavonoide en $AlCl_3$ 2% etanólico.....	47
5.1.3 Contenido de flavonoides en cápsula de ajo y cápsula Matico.....	50
<b>5.2 Identificación de flavonoides.....</b>	<b>52</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>8. GLOSARIO.....</b>	<b>72</b>
<b>9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Grupos principales de flavonoides y sus fuentes en alimentos .....	6
Tabla 2. Clases y ejemplos de flavonoides.....	7
Tabla 3: Especies reactivas de oxígeno que puede ser inhibida por flavonoides .....	12
Tabla 4: Efectos farmacológicos estudiados para diferentes tipos de flavonoides .....	14
Tabla 5: Concentraciones de soluciones para curva de calibrado.....	38
Tabla 6: Longitudes de onda para los diferentes estándares de flavonoides a estudiar y celdas espectrofotométricas para cada una de estos.....	39
Tabla 7: Longitudes de onda para las diferentes muestras de estudio y celdas espectrofotométricas para cada una de estos. ....	39
Tabla 8: Resultados obtenidos en la determinación de flavonoides totales de extracto de ajo, mediante el método de kumazawa, expresados como la media de 6 resultados $\pm$ desviación estándar.....	50
Tabla 9: Resultados obtenidos en la determinación de flavonoides totales de extracto de matico, mediante el método de kumazawa, expresados como la media de 6 resultados $\pm$ desviación estándar.....	51
Tabla 10: Concentraciones de soluciones estándar de flavonoides para corrimiento de bandas. ....	52
Tabla 11: Ajuste de concentración de las soluciones flavonoides .....	53
Tabla 12: Concentraciones obtenidas para las soluciones de los extractos secos analizados.....	53
tabla 13: Valores asociados a los máximos de las banda I y II mostradas en el espectro metanólico para los distintos estándares. ....	54
Tabla 14: Valores asociados a los máximos de las banda I y II mostradas en espectro metanólico- $\text{AlCl}_3$ en los distintos estándares.....	56
Tabla 15: Longitud de onda máxima absorbancia en los distintos estándares de flavonoides.....	56



Tabla 16: Valores asociados a los máximos de las banda I y II mostradas en espectro metanólico en las cápsulas. ....	56
Tabla 17: Valores asociados a los máximos de las banda I y II mostradas en espectro metanólico- $\text{AlCl}_3$ en las distintas cápsulas.....	57
Tabla 18: Valores de longitud de onda máxima en las distintas cápsulas. ....	58

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de plantas.....	5
Figura 2: Estructura general de flavonoides. ....	6
Figura 3: Estructura de un flavonoide glicosilado (a) y flavonoide aglicona (b). .	9
Figura 4: Representación esquemática de la biosíntesis de flavonoides. Ruta del ácido shiquímico. ....	10
Figura 5: Bandas características de los flavonoides. ....	19
Figura 6: Cromóforos para la absorbanca de luz de flavonoides .....	20
Figura 7: Estructura química quercetina. ....	22
Figura 8: Estructura química apigenina .....	23
Figura 9: Estructura química hesperidina .....	24
Figura 10: Estructura química genisteína .....	25
Figura 11: Estructura química catequina .....	25
Figura 12: Formación de complejo flavonoide- $AlCl_3$ .....	38
Figura 13: Diagrama cuantificación flavonoide total.....	40
Figura 14: Esquema identificación de flavonoides .....	42
Figura 15: Gráficas de curvas de calibrado de los estándares de flavonoide analizados. (a) quercetina; (b) catequina; (c) hespridina; (d) genisteína y (e) apigenina. ....	45
Figura 16: Gráfica curva de calibrado estándar de flavonoide en $alcl_3$ 2 % etanólico. (a) quercetina; (b) catequina; (c) hespridina; (d) genisteína y (e) apigenina. ....	48
Figura 17: Intensidades de las bandas I y II observadas en el análisis de los estándares de flavonoides. ....	54
Figura 18: Espectrograma uv-vis mostrando el corrimiento de las bandas observadas en el análisis de los estándares de flavonoides, sin y con exposición a $alcl_3$ (indicada con la flecha roja). ....	55
Figura 19: Espectrograma UV-Vis mostrando el corrimiento de los extractos vegetales de ajo y matico respectivamente.....	57

Figura 20: Espectrograma UV-vis mostrando el corrimiento de las bandas I y II observadas en el análisis de los extractos vegetales ajo y matico, sin y con exposición a $AlCl_3$ (indicada con la flecha roja).....	58
Figura 21: Posibles espacios de coordinación en alguna estructura de flavonoides.....	64
Figura 22: Posibles posiciones de quelaciones en los estándares de flavonoides estudiados. Quercetina, catequina, hesperidina, genisteína y apigenina.....	66
Figura 23: Espectrograma UV-Vis comparativo de corrimiento de bandas observadas entre quercetina estándar y extracto seco de ajo.....	67
Figura 24: Espectrograma comparativo extracto matico con catequina, quercetina, apigenina y hesperidina.....	68

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Tabla curva de calibrado quercetina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	81
Anexo 2: Tabla curva de calibrado quercetina-etanol- $\text{AlCl}_3$ por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	82
Anexo 3: Tabla curva de calibrado catequina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	83
Anexo 4: Tabla curva de calibrado catequina-etanol- $\text{AlCl}_3$ por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	84
Anexo 5: Tabla curva de calibrado hesperidina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	85
Anexo 6: Tabla curva de calibrado hesperidina-etanol- $\text{AlCl}_3$ por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	86
Anexo 7: Tabla curva de calibrado genisteína-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	87
Anexo 8: Tabla curva de calibrado genisteína-etanol- $\text{AlCl}_3$ por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	88
Anexo 9: Tabla curva de calibrado apigenina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	89
Anexo 10: Tabla curva de calibrado apigenina-etanol- $\text{AlCl}_3$ por sextuplicado e indicadores estadísticos.....	90
Anexo 11: Tabla absorbancias muestra cápsula de ajo-etanol y muestra cápsula ajo-etanol- $\text{AlCl}_3$ , Natura laboratorios, por sextuplicado e indicadores estadísticos. ....	91
Anexo 12: Tabla absorbancias de extracto seco expresado en mg de quercetina (QUE).....	92
Anexo 13: Tabla absorbancias muestra cápsula matico-etanol y muestra cápsula matico-etanol- $\text{AlCl}_3$ , por sextuplicado e indicadores estadísticos. ....	93
Anexo 14: Tabla absorbancias de extracto seco matico expresado en mg de catequina (CA) .....	94

Anexo 15: Valores de peak máximo de estándares y muestras de flavonoides en concentración inicial de 0,001 mg/mL para estándares. (a) quercetina, (b) catequina, (c) hesperidina, (d) genisteína y (e) apigenina. ....	95
Anexo 16: Ajuste de concentración en espectro metanólico para la determinación de peak de cada estándar de flavonoide entre 0,6 y 0,9 abs. (a) quercetina, (b) catequina, (c) hesperidina, (d) genisteína y (e) apigenina. ....	98
Anexo 17: Ajuste de concentración en espectro metanólico-AlCl <sub>3</sub> para la determinación de peak de cada estándar de flavonoide entre 0,6 y 0,9 abs. (a) quercetina, (b) catequina, (c) hesperidina, (d) genisteína y (e) apigenina. ....	101
Anexo 18: Soluciones de muestra de estudio en espectro metanólico y metanólico-AlCl <sub>3</sub> para la determinación de peak de cada muestra. (a) cápsula de ajo-metanol, (a.1) cápsula de ajo-metanol-AlCl <sub>3</sub> , (b) matco-metanol, (b.1) matico-metanol-AlCl <sub>3</sub> . ....	104

## RESUMEN

El uso de productos naturales con fines terapéuticos se ha incrementado en la actualidad, tomando en cuenta la experiencia recogida desde nuestros ancestros con respecto al uso de las plantas medicinales. Los compuestos activos derivados de especies vegetales se han utilizado para diversos problemas de salud debido a la variedad de propiedades que poseen. Entre los principales metabolitos secundarios producidos por las plantas se encuentran los que siguen la ruta del ácido shikímico. Estos corresponden a una familia muy extensa de compuestos generalmente de estructura polifenólica. Dentro de esta familia se encuentran los flavonoides, los que presentan una estructura básica que comprende dos anillos aromáticos unidos entre sí mediante una cadena carbonada de tres átomos, con uno o más grupos hidroxilo. Debido a la presencia de dobles enlaces conjugados estos compuestos son capaces de presentar fluorescencia frente a la luz UV.

El objetivo de este estudio fue la identificación y cuantificación mediante la técnica espectrofotométrica UV-Vis, de diferentes tipos de flavonoides pertenecientes a las subfamilias: flavonol, flavononas, flavon-3-ol, isoflavonas y flavanonas; mediante la utilización de estándares comerciales de estos flavonoides. Aplicando la metodología implementada a dos muestras de extractos secos de ajo y matico, formulados como cápsulas, se pudo evidenciar la presencia de flavonoides característicos: quercetina en el caso de las cápsulas de ajo y de apigenina, quercetina y catequina para las de matico. En el caso del ajo, una cápsula de 300 mg contiene 7,72 mg QE/g extracto seco, sin embargo, este dato no se precisa en el etiquetado. Para el caso del matico, la cápsula de 200mg contiene 10, 12 mg CA/g extracto seco, lo cual concuerda estadísticamente con los 9,0 mg expresados como catequina que declara la etiqueta del fitofármaco. Por lo anteriormente mencionado, este trabajo se demostró que es posible identificar y diferenciar las estructuras flavónicas presentes en un extracto vegetal, mediante la técnica espectroscopía UV-Vis.

## **ABSTRACT**

Nowadays, the use of natural products for therapeutic purposes based on the knowledge our ancestors gathered on medicinal plants has increased. The active components of plants have been used to treat health problems given their vast properties. Shikimic acid is a secondary metabolite in plants, which is part of the wider family of phenolics; these are used to produce flavonoids, with a basic structure consisting of two phenyl rings joined by a carbon chain of three atoms, with one or more hydroxyl group. Due to double conjugated bonds, these compounds are able to fluoresce when exposed to ultraviolet light.

The purpose of this study was to identify and quantify, by way of ultraviolet-visible spectroscopy, different types of flavonoids in the flavonols, flavones, flavon-3-ols, isoflavones and flavonones sub-families by using their commercial standards. Two dry samples of garlic and orange ball tree in formulated capsules were analyzed, showing characteristic flavonoids such as quercetin in garlic capsules and apigenin, quercetin and catechin in orange ball tree capsules. The 300-mg garlic capsule contains 7.72 mg QE/g of dry extract, but the label does not mention this. The 200-mg orange ball tree capsule contains 10.12 mg CA/g of dry extract, statistically coinciding with the 9.0 mg of catechin mentioned in the label of this phytomedicine.

In conclusion, this study effectively demonstrated that flavone structure of plants can be identified and differentiated using the ultraviolet-visible spectroscopy method.

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

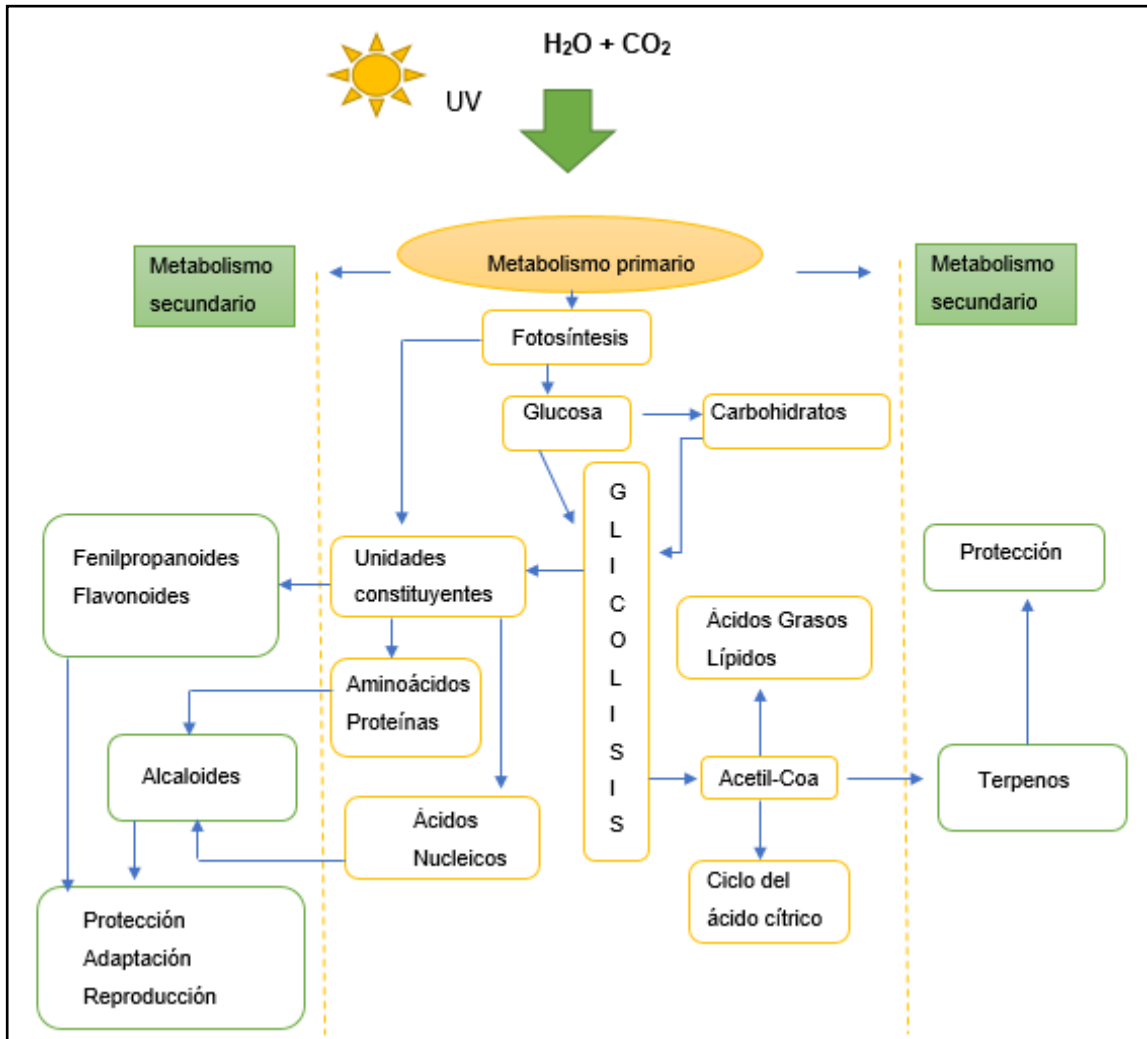
Desde nuestros antepasados, a través de las culturas, el ser humano ha curado sus enfermedades con lo que la naturaleza le ha otorgado, así es como el empleo de las plantas medicinales sin procesar ha permanecido en el tiempo, existiendo actualmente un alto consumo de estas, especialmente en forma de infusiones.

Las especies vegetales, dada su gran diversidad, producen diversos tipos de compuestos, dependiendo de las vías metabólicas que genéticamente distinguen a cada familia de plantas(1).

En primer lugar, el proceso de la fotosíntesis, vital para el funcionamiento de la planta, el transporte de solutos para su crecimiento y la diferenciación celular lleva consigo la producción de metabolitos primarios (Figura 1). Se pueden definir a estos últimos como aquellos metabolitos necesarios para la planta y que provienen de la ruta de los carbohidratos, aminoácidos y lípidos(1).

Por otra parte, como consecuencia de la especialización a partir de estas moléculas constructoras primarias cada especie produce mediante rutas biogénicas diferentes, los metabolitos secundarios que no tienen una función vital para planta, pero participan en funciones de protección, adaptación y reproducción (Figura 1) (1).

Figura 1: Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de plantas.



Fuente: Elaboración propia

## 1.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides, uno de los principales grupos de metabolitos secundarios de interés para el ser humano, fueron descubiertos en 1930 por el premio nobel Szent-Gyorgyi, a partir del procesamiento de la citrina presente en la cáscara del limón (2). Estos protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Además, participan en la coloración de las partes aéreas de las plantas, fundamentalmente hojas, flores y frutos(2)(3).

Estos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal ya sea en forma libre o formando glicósidos, algunos grupos de flavonoides se encuentran más ampliamente distribuidos que otros (3)(4). Como se muestra en la tabla 1, existe una gran diversidad de vegetales que son fuente de flavonoides, según sea la naturaleza química de los mismos (Tabla 1).

**Tabla 1: Grupos principales de flavonoides y sus fuentes en alimentos (5).**

Grupos de Flavonoides y sus fuentes	
Flavonoides Grupos	Principales fuentes
<b>Antocianidinas</b>	Los berries de color rojo, azul y púrpura; las uvas rojas y moradas; manzana roja y vino tinto.
<b>Flavanoles</b>	Té verde, cacao, uvas, berries, manzana, cacao y vino tinto.
<b>Flavanonas</b>	Frutas cítricas.
<b>Flavonoles</b>	Cebolla, col, brócoli, manzana y té.
<b>Flavonas</b>	Perejil, tomillo, apio y orégano.
<b>Isoflavonas</b>	Soja y leguminosas.

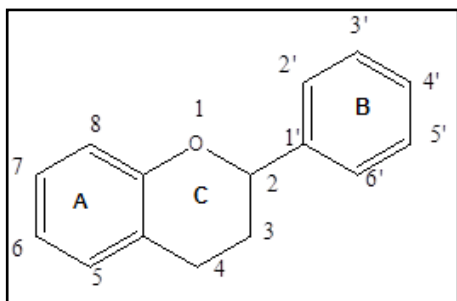
Fuente: sitio web antioxidantes. <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos>

### 1.1.1 Estructura química de los flavonoides

Los flavonoides consisten en un gran grupo de compuestos polifenólicos que tienen una estructura de benzo- $\gamma$ -pirona(6).

Químicamente los flavonoides se basan en un esqueleto de quince carbonos formado por dos anillos de benceno A y B (Figura 2) vinculado a través de un anillo heterocíclico pireno (Anillo C) (7).

**Figura 2: Estructura general de flavonoides.**

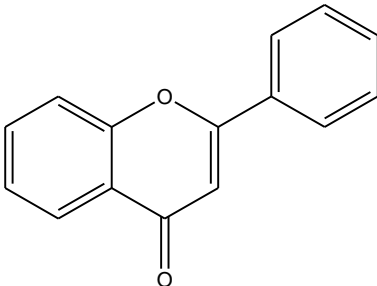
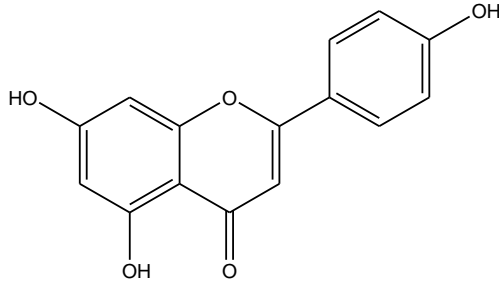
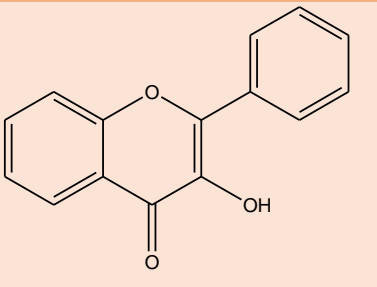
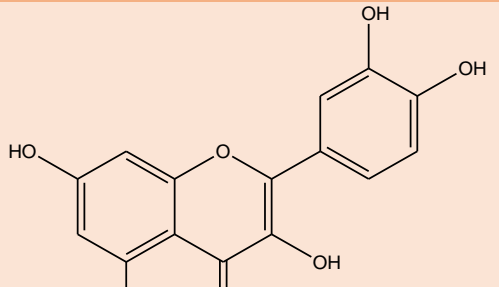


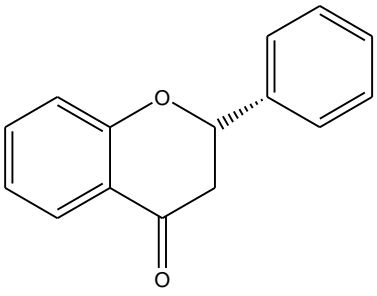
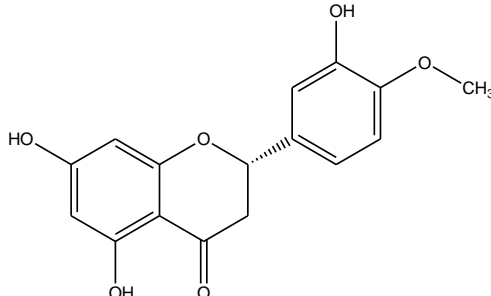
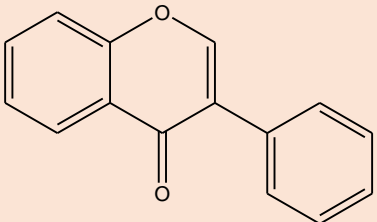
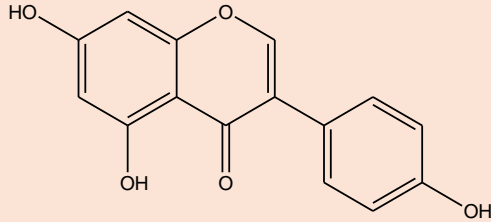
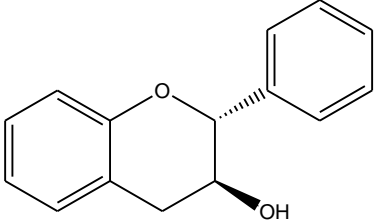
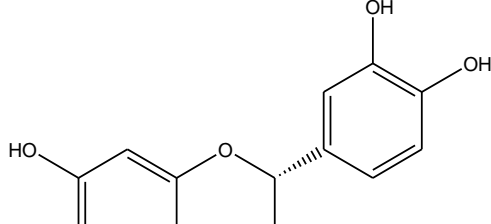
Fuente: elaboración propia

Los flavonoides se pueden subdividir en diferentes subgrupos dependiendo del carbono del anillo C al cual se une el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C (4). Los flavonoides en los que el anillo B está vinculado en la posición 3 del anillo C se llaman isoflavonas (4). Aquellos en que el anillo B está vinculado en la posición 4 se llaman neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 2 se puede subdividir en varios subgrupos en base a las características estructurales del anillo C (4). Estos subgrupos son: flavonoides, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavonoides o catequinas, antocianinas y chalconas(4).

Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B (4).(Tabla 2)

**Tabla 2. Clases y ejemplos de flavonoides.**

Clases de Flavonoides		
Grupo	Estructura	Ejemplo
Flavonas		 Apigenina
Flavonol		 Quercetina

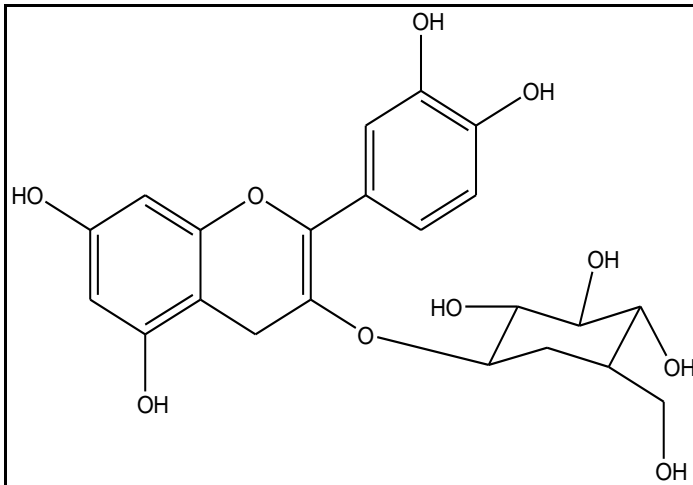
Grupo	Estructura	Ejemplo
Flavanona		 Hesperitina
Isoflavona		 Genisteína
Flavan-3-ols		 Catequina

Fuente: Elaboración propia

Los flavonoides generalmente se encuentran como flavonoides o-glicósidos, en los cuales uno o más grupos hidroxilos del núcleo del flavonoide están unidos a azúcares(4) (8). La glicosilación de los flavonoides trae consigo que estos sean menos reactivos y más solubles en agua, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua (8). Por otro lado, las agliconas menos polares como isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en solventes tales como éteres y cloroformo (Figura 3)(8).

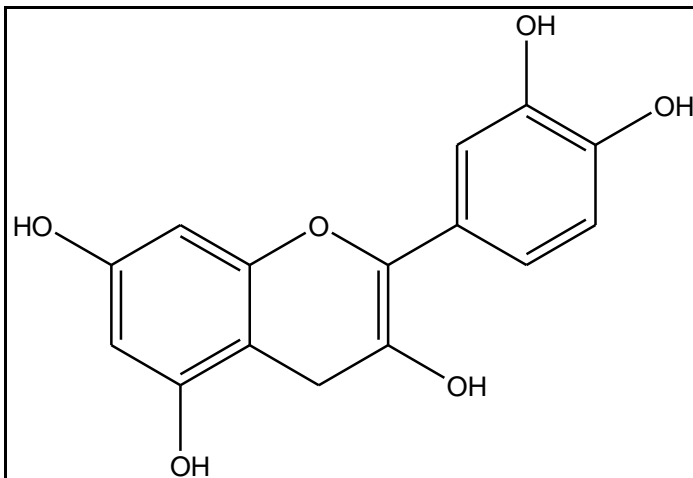
Figura 3: Estructura de un flavonoide glicosilado (a) y flavonoide aglicona (b)(9).

(a) Flavonoide Glicosilado



Fuente: elaboración propia

(b) Flavonoide Aglicona



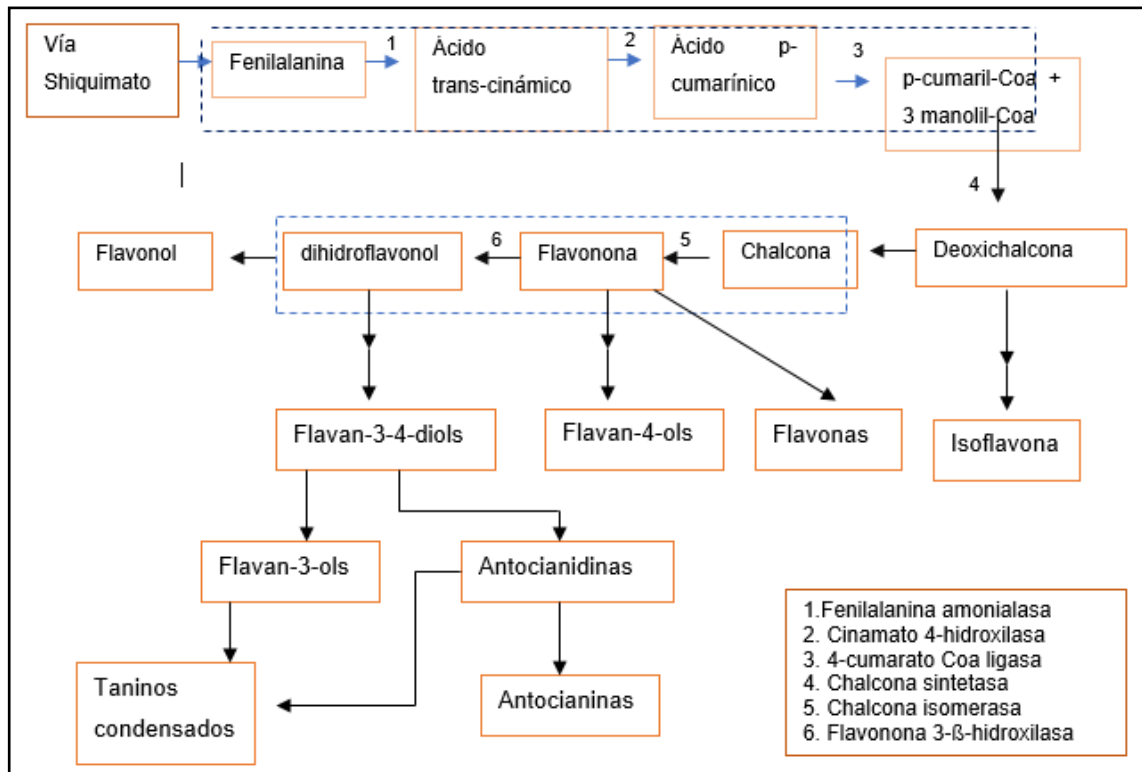
Fuente: elaboración propia

### 1.1.2 Biosíntesis flavonoides

La estructura de flavonoides y sus respectivas clases, resulta de dos vías biosintéticas separadas, la vía del ácido shiquímico y la vía del ácido malónico (10). El puente de un anillo aromático (anillo B) constituye un fenilpropanoide biosintetizado desde fenilalanina, siendo un producto de la ruta del ácido shiquímico. El sexto carbono del otro anillo aromático (anillo A) es originado a partir de la condensación de tres unidades de acetato vía ácido malónico(11). La

fusión de estas dos partes involucra la condensación de un fenilpropanoide, para-cumaril Coa, con tres residuos de manoil Coa en una reacción catalizada por la chalcona sintasa(10) (11) (Figura 4).

**Figura 4: Representación esquemática de la biosíntesis de flavonoides. Ruta del ácido shiquímico.**



Fuente: elaboración propia

## 1.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS FLAVONOIDES.

### 1.2.1 Capacidad antioxidante

La mayoría de los flavonoides presentan capacidad antioxidante, incluidos los que se estudiaron en este trabajo. La actividad antioxidante de los flavonoides depende de sus características estructurales y de las propiedades óxido-reducción (redox) de sus grupos hidroxifenólicos(12). Su capacidad antioxidante se atribuye a su habilidad de formación de quelatos con metales tri y divalentes, atrapar radicales libres e inhibir enzimas(12).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica(2). Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; pueden quelar iones metálicos transitorios, tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres(2).

Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones(3)(13). Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias(13).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son(2):

- 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(2).
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C(2).
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante(2).

Por lo tanto, los flavonoides son químicamente donantes de un solo electrón(14). Sirven como derivados del anillo conjugado y grupos hidroxilo que tienen el potencial de funcionar como antioxidantes en el cultivo celular *in vitro* o sistemas libres de células eliminando el anión superóxido, el oxígeno singlete, los radicales peroxilípidos, y/o estabilizando radicales libres implicados en procesos oxidativos, a través de la hidrogenación o complejación con especies oxidantes



(Tabla 3) (15). Los estudios *in vitro* pueden demostrar flavonoles, flavonas y también para antocianinas una actividad antioxidante considerable, principalmente basada en la eliminación de radicales de oxígeno (14) (15).

**Tabla 3: Especies reactivas de oxígeno que puede ser inhibida por flavonoides(15).**

<b>Especies Reactivas</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>O<sub>2</sub> (Anión Superóxido)</b>	Producto de reducción de un electrón de O <sub>2</sub> . Producido por fagocitos, formado en reacción de autooxidación y generado por oxidasas.
<b>HO<sub>2</sub></b>	Forma protonada de O <sub>2</sub>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de hidrógeno)</b>	Producto de reducción de dos electrones de O <sub>2</sub> formado desde O <sub>2</sub> por dismutación o directamente desde O <sub>2</sub> . Reactividad de O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> se amplifica en presencia de hemo proteínas.
<b>OH (Radical hidroxil)</b>	Tres productos de reducción de electrones de O <sub>2</sub> generado por la reacción de Fenton, metal de transición (hierro, cobre) – Catalizada por reacción de Haber-Weiss; además formado por la descomposición de peroxinitrito producido por reacción de O <sub>2</sub> con radical de óxido nítrico.
<b>RO. (radical alcoxi), ROO. (Radical peroxi)</b>	Lípido peroxi radical (LOO) producido de hidroperóxido orgánico, ROOH por abstracción de hidrógeno.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete

Fuente: Kaur H, Bimlesh K, Prasher S, Salhan M. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Sci.* 2011;1:4.

Las flavonas y las catequinas parecen ser los flavonoides más poderosos para proteger el cuerpo contra las especies reactiva de oxígeno (ROS)(16). Las células del cuerpo y los tejidos son continuamente amenazadas por el daño causado por los radicales libres y ROS que son producido durante el metabolismo de oxígeno normal o son inducidos por un daño exógeno(16). Los radicales libres y ROS han sido implicados en una gran cantidad de enfermedades humanas(16).

Quercetina, canferol, mircetina y rutina actúan como antioxidantes, exhibiendo efectos beneficiosos como antiinflamatorios, antialérgico, antiviral, y actividad anticancerígeno(4) (16). También juega un papel protector en las enfermedades del hígado, cataratas y enfermedades cardiovasculares(14). Quercetina y silibina, ejercen una protección en la perfusión hepática del tejido isquémico dañado (14). La actividad antioxidante de barrido de flavonoides se ha informado que está

en el orden: Miricetina> quercetina> ramnetina> morina> diosmetina> naringenina> apigenina> catequina> 5,7-dihidroxi-3', 4', 5'-trimetoxiflavona > robinina> canferol> flavona(16).

### 1.2.2 Efectos farmacológicos

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares) (17) (18).

Estudios llevados a cabo en humanos, demuestran que la citrina (mezcla de hesperidina y eriodictiol glucósido) es capaz de normalizar la resistencia vascular alterada por distintas patologías. Igualmente, el O-(hidroxietil)-rutósido permite restaurar los parámetros alterados por la insuficiencia venosa crónica(18).

Asimismo, ensayos *in vitro* realizados sobre arterias aisladas de animales de experimentación demuestran la existencia de flavonoides con acción relajante sobre el músculo liso vascular(16). No obstante, conviene señalar que determinadas moléculas de estructura flavonoide han mostrado una acción bifásica sobre los vasos sanguíneos: vasoconstrictora a las concentraciones activas más bajas y vasodilatadora a concentraciones mayores(19). Este es el caso de aquellos compuestos con una triple sustitución hidroxílica en posiciones contiguas de los anillos A o B, como la baicaleína y la miricetina(18).

Uno de los efectos más considerables son sus propiedades antioxidantes en la prevención de enfermedades como cáncer, las enfermedades cardiovasculares, alergias, fragilidad vascular e infecciones virales y bacterianas(14) (Tabla 4).

En fitoterapia los flavonoides se emplean principalmente en casos de fragilidad capilar como venotónicos. Aunque también se utilizan en proctología como antihemorroidales, y en el tratamiento de metrorragias y retinopatías(17).

**Tabla 4: Efectos farmacológicos estudiados para diferentes tipos de flavonoides**

Actividad Farmacológica	Flavonoide	Referencia
<b>Analgésica</b>	Quercetina, hesperidina	(4) (6) (15)
<b>Antialérgica</b>	Quercetina	(2) (4) (6) (15)
<b>Antiaterogénica</b>	Quercetina, apigenina	(15)
<b>Anticancerígena</b>	Quercetina, rutina, genisteína, hesperidina, apigenina.	(7) (15) (16) (18) (13) (14).
<b>Antidiabética</b>	Quercetina	(15)
<b>Antidiarréica</b>	Apigenina, quercetina.	(15) (16)
<b>Antihepatotóxica</b>	Quercetina.	(2) (16)
<b>Antiinflamatoria</b>	Apigenina, quercetina,	(4) (8) (18)
<b>Antiosteoporótica</b>	Ipriflavona	(18)
<b>Antiespasmódica</b>	Apigenina, crisina, kaenferol, quercetina	(2) (15) (18)
<b>Antiulcerosa</b>	Kaenferol, quercetina, rutina.	(16) (18)
<b>Estrogénica</b>	Genisteína	(20)
<b>Protector Vascular</b>	Antocianidina, citrina, rutósido	(15)

Fuente: elaboración propia

También han sido descritas las propiedades antiagregantes plaquetarias de algunos de estos compuestos, como la apigenina, crisina y fletina(20), considerándose que la inhibición de la ciclooxigenasa y el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico son los principales mecanismos implicados en dicha actividad (20).

Por otra parte, muchos flavonoides poseen propiedades antiinflamatorias como consecuencia de sus interacciones *in vitro* con los polinucleares y los trombocitos o con el metabolismo del ácido araquidónico (18). Este es el caso de la miricetina y la quercetina que, a concentraciones relativamente altas, son capaces de bloquear *in vitro* los mecanismos de acción de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, mientras que a concentraciones bajas inhiben sólo la acción de la lipoxigenasa(15). Estas propiedades antiinflamatorias también se han

demostrado *in vivo* para apigenina, rutina, quercetina y luteolina, en distintos modelos de inflamación aguda y/o crónica(15).

Algunos flavonoides (como naringina y quercetina) no sólo presentan buena actividad antiinflamatoria, sino que además protegen la mucosa gástrica frente a una gran variedad de agentes ulcerogénicos, combinación que resulta de interés terapéutico si recordamos que uno de los principales efectos secundarios de los fármacos antiinflamatorios convencionales es su actividad ulcerogénica(16) (18).

Esta acción gastroprotectora puede ser explicada, en parte, mediante un complejo mecanismo no prostaglandino-dependiente que implicaría aumentos en el contenido de glicoproteína y de la viscosidad del gel mucosal gástrico(18). Otros mecanismos implicados en esta acción son: captación de radicales libres, actividad antioxidante, estimulación de prostaglandinas, inhibición de la producción de leucotrienos o del factor activador de plaquetas(18). Asimismo, los flavonoides flavona, flavanona y quercetina inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori* y la formación de ácido por las células parietales en respuesta a la estimulación por histamina y dibutiril AMP cíclico(16).

Por otro lado, algunos flavonoides, como quercetina, hesperidina y miricitrina, ejercen actividad analgésica en diversos modelos de experimentación animal, aunque el mecanismo de acción continúa sin esclarecerse(4) (15).

En cuanto a sus efectos sobre el sistema nervioso central, experiencias realizadas con animales presentan a los flavonoides como posibles agentes neuroprotectores(18). Este efecto protector se ha asociado a sus propiedades antioxidantes, captadoras de radicales libres e inhibidoras de la peroxidación lipídica y de la xantina oxidasa(18).

Las isoflavonas disminuyen los síntomas de la menopausia y disminuyen el riesgo de desarrollo de osteoporosis, estos son considerados como

fitoestrógenos debido a su similitud estructural con las hormonas estrogénicas (20).

Además, hay que señalar que la inhibición que ejercen los flavonoides sobre numerosos enzimas (responsable de algunas de sus propiedades terapéuticas) también puede dar lugar a distintas interacciones farmacológicas(18). Así, los flavonoides modulan la actividad del citocromo P450 monooxigenasas, enzimas implicados en la farmacocinética de numerosos medicamentos(15). Por ello, no es de extrañar que con frecuencia se produzcan interacciones por la administración simultánea de flavonoides con fármacos que sufran este metabolismo, produciéndose un aumento de la toxicidad del propio fármaco o bien una disminución de su efecto terapéutico(15) (18).

### **1.2.3 Flavonoides como principios activos de fitofármacos**

Los fitofármacos son productos farmacéuticos terminados y etiquetados, constituidos exclusivamente por partes de plantas o preparaciones vegetales (Art.26º-D.S.286/01). Se encuentran regulados por el Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos del MINSAL y su registro se realiza en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP)(21). Se elaboran teniendo como premisa las mismas regulaciones que se siguen para la elaboración de fármacos. Dentro de las principales formas farmacéuticas en las cuales se puede formular un fitofármaco se encuentran: polvos, gránulos, gotas, cápsulas, comprimidos, grageas, pastas, ungüentos, geles y cremas, entre otros. Estos contienen ingredientes activos estandarizados que están formados por los metabolitos secundarios presentes en las diferentes preparaciones vegetales.

Los fitofármacos forman parte la medicina alopática y se emplean para el tratamiento de enfermedades o padecimientos definidos, según sea el efecto farmacológico atribuido a las diferentes familias de principios fitoquímicos como vimos anteriormente.

Se encuentran ampliamente comercializados en Chile, especialmente aquellos fitofármacos en los cuales se han cuantificado los compuestos antioxidantes como son polifenoles y flavonoides. Un ejemplo de ello, son los fitofármacos en base a ajo y matico que se dispensan bajo variadas formulaciones. A continuación, se muestran dos fitomedicamentos que serán objeto de estudio en este trabajo.

- Cápsulas de Ajo, droga vegetal *Allium sativum*, posee propiedades farmacológicas características como: hipolipemiente, antiaterosclerótico, hipoglicemiente, anticoagulante, antihipertensivo, antimicrobiano, hepatoprotector, previene síntomas de gripe y exhibe propiedades anti cáncer(22). Estas propiedades se sustentan por el contenido de metabolitos primarios y secundarios que contiene el ajo fundamentalmente: proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, compuestos azufrados y no azufrados, dentro de estos últimos la “quercetina”, flavonoide que como hemos mencionado anteriormente tiene efectos antiinflamatorios e inmunoprotectores, ejerce la acción de estabilizar a los mastocitos, mejorando los estados alérgicos y produciendo efectos beneficiosos en el asma (23) (24).
- Cápsulas de Matico, droga vegetal *Buddleja globosa* Hope, posee propiedades farmacológicas que la hacen útil en el tratamiento de úlceras estomacales y diarrea, es una de las plantas más apreciadas en medicina popular por sus propiedades cicatrizantes. Especialmente las hojas se utilizan en el tratamiento de una serie de síntomas del aparato digestivo: dolor de estómago, úlceras estomacales, diarrea, colitis, afecciones hepáticas y de la vesícula; también en los casos de golpes y heridas internas. En forma externa se emplea para lavar heridas y úlceras, y en lavados vaginales (25) (26).

### 1.3 IDENTIFICACIÓN ANALÍTICA DE FLAVONOIDES

Existen muchas técnicas estandarizadas para la identificación de los flavonoides, entre ellas se encuentran las reacciones de coloración y precipitación, espectrofotometría ultra violeta, espectrofotometría infrarroja, espectrofotometría de masas, difracción de rayos x, y resonancia magnética nuclear(27). Las reacciones de coloración pueden usarse también para evidenciar la presencia de flavonoides, una de las más específicas es la reacción de Shinoda, de la que resultan coloraciones características según el tipo flavonoides(27).

#### 1.3.1 Espectrometría UV-vis

El método más usual para un análisis preliminar de la estructura de un flavonoide es quizás la absorción UV-Vis; esta técnica es utilizada tanto para identificar el tipo de flavonoide como el modelo de oxigenación. Este último puede además ser el mejor definido por el uso de reactivos de desplazamientos los cuales, como su nombre lo indica, provocan el desplazamiento de bandas de absorción(28).

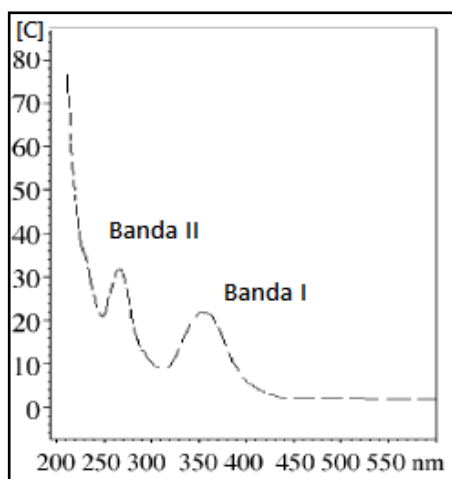
Los estudios sobre flavonoides por espectrometría UV han revelado que gracias a los anillos bencénicos que poseen en su estructura, son capaces de absorber radiación ultravioleta(28). Esto sumado con la ruta biosintética de la cuál provienen, le confieren a la molécula sus características espectrales(28).

La mayoría de los flavonoides exhiben dos principales bandas de absorción: la banda I (320-385 nm) representa la absorción de anillo B mientras que la banda II (250-285 nm) corresponde al anillo aromático A (Figura 5)(28).

La posición de estas bandas permite distinguir entre los diversos tipos de flavonoides(12). Por ejemplo, flavonas y flavonoles con grupos OH en el anillo A, pero no en el anillo B, tienden a dar un espectro en metanol con pronunciada banda en II y una banda I débil, pero en moléculas similares que también poseen

grupos OH en el anillo B, la banda I es más pronunciada y aparece a mayor longitud de onda(5) (12). El espectro en metanol, particularmente la posición de la banda I (entre 300 y 380 nm), proporciona información sobre el tipo de flavonoide(4) (28) (29) (30)

**Figura 5: Bandas características de los flavonoides(12).**



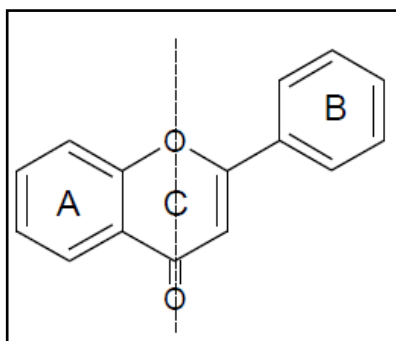
Fuente: Silva L, Pezzini B, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(41):96

Las variantes estructurales existentes dentro de la familia de los flavonoides tienden a absorber dentro de un rango que va desde los 220 a los 600 nm, por lo tanto, grupos funcionales unidos a el esqueleto flavonoide puede causar un cambio en la absorción, a partir de 367 nm hasta 380 nm (28)(31). En consecuencia, la banda I siempre absorbe en una longitud de onda más corta en 20-30 nm(28).

Generalmente se presentan dos máximos de absorción que varían en intensidad y longitudes de onda según la naturaleza del núcleo flavónico; uno a longitud de onda corta (320-385 nm) referido como banda I correspondiente al sistema aromático B y otro a longitud de onda larga (250-285 nm) referido como banda II correspondiente al sistema aromático A, debido a la existencia de dos grupos cromóforos (Figura 6), los grupo cinamoilo y benzoilo, respectivamente(19).



Figura 6: Cromóforos para la absorción de luz de flavonoides(31)



Fuente: Sitio web, [https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2852856\\_ijms-11-00595f10&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2852856_ijms-11-00595f10&req=4)

La insaturación entre los carbonos 2 y 3, la posición de los grupos hidroxilo en las agliconas, o la presencia de residuos de carbohidratos afectan la absorción de los núcleos causando desplazamientos bato e hipsocrómicos, debido a que este tipo de grupos auxocromos (grupos hidroxilos) contribuyen electrónicamente a los sistemas aromáticos, al tiempo que las insaturaciones favorecen la conjugación del grupo fenilo (anillo B) con el grupo carbonilo encontrado en el anillo heterocíclico tipo pirona, como se puede apreciar en las estructuras de resonancia tanto del anillo A, como del anillo B(19).

Flavanonas tiene un anillo C heterocíclico saturado, sin conjugación entre los anillos A y B, lo que muestra una banda II muy fuerte máximo de absorción entre 270 y 295 nm, y solo un máximo para la Banda I a 326 y 327 nm(19) (31). La banda II aparece como un pico (aproximadamente 270 nm) en compuestos mono-sustituídos(19) (31).

Las flavonas y flavonoles, por contar con su insaturación entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, presentan sus dos bandas de absorción de intensidad considerable en los rangos (310-350) nm y (350-385) nm para la banda I, y (250-280) nm para las bandas II, respectivamente(19).

En el caso de las antocianinas, estas muestran picos de banda I distintivos en la región de 450-560 nm debido al sistema de hidroxil-cinamoilo del anillo B y picos

en la Banda II en la región 240-280-nm debido al sistema benzoilo del anillo A (4) (28) (29).

### **1.3.2 Comportamiento del espectro UV-Vis con reactivos de desplazamiento**

La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) con y sin ácido clorhídrico (HCl)(32).

El NaOMe es una base fuerte que ioniza los hidroxilos fenólicos presentes en la molécula y particularmente permite reconocer la existencia de grupos hidroxilo en 3 y 4'(32). Las flavonas 4'-hidroxiladas y los flavonoles 3-O-sustituidos presentan desplazamiento batocrómico de 45-65 nm para la banda I al añadir NaOMe, y la intensidad de la banda no decrece(30). El NaOAc es una base más débil que el NaOMe, y ioniza solo los hidroxilos fenólicos más ácidos: 3, 4' y 7(32).

La ionización del hidroxilo en 7 afecta la banda II y por lo tanto el NaOAc es un reactivo útil para determinar la presencia de dicho hidroxilo(32). Si al añadir el NaOAc se observa un desplazamiento batocrómico de 5-20 nm en la banda II se trata de una flavona o flavonol 7-hidroxilado(32). El  $AlCl_3$  anhidro forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxilados, 3- hidroxilados y 5-hidroxilados(32). En el caso de los orto-dihidroxilados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxilados son estables(30) (32).

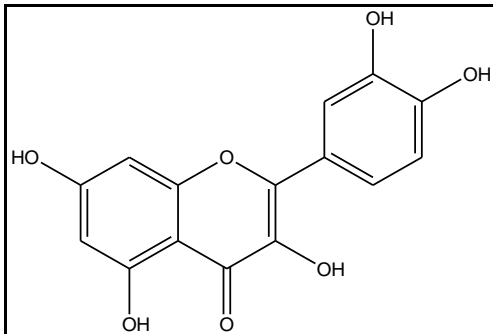
## 1.4 EJEMPLOS DE FLAVONOIDES CON INTERÉS FARMACÉUTICO.

Entre los flavonoides más encontrados en la naturaleza se encuentran: quercetina, apigenina, catequina, hesperidina y genisteína los cuales serán objeto de estudio en esta investigación.

### 1.4.1 Quercetina

Quercetina es un bioflavonoide polifenólico o flavonoide más abundante, que generalmente se clasifica como flavonol(6) (2) (4) (15). Su nomenclatura según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavanona (o su sinónimo 3,3',4', 5,7- pentahidroxi-2-fenilcloro-4-ona) ( Figura 7)(6). La quercetina es un aglicona que carece de un azúcar adjunto. Es de color amarillo brillante, completamente insoluble en agua fría, poco soluble en agua caliente, pero bastante soluble en etanol, aumentando su solubilidad en metanol (33).

Figura 7: Estructura química Quercetina.



Fuente: elaboración propia

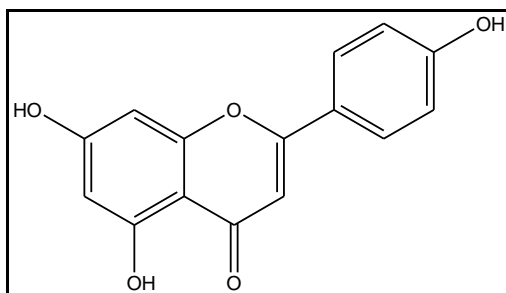
La quercetina es considerado el flavonoide más estudiado tanto desde el punto de vista químico como farmacológico (2)(4)(6)(3)(15)(17)(19) se ha demostrado su gran capacidad antioxidante y además se ha llegado incluso a realizar estudios clínicos de fase I (34).

En los primeros estudios clínicos realizados en 1975, la quercetina se administró en un vehículo etanólico a seis voluntarios humanos normales en a una dosis fija de 100 mg sin efectos secundarios (35). En un estudio efectuado por Dr. Ferry y col. en el año 1996, se realizó una escalada de dosis fase I prueba con 60 mg / m<sup>2</sup> como dosis inicial para detectar quercetina en plasma y sus efectos (36). Los resultados mostraron que los pacientes que recibieron dosis de hasta 10.8 mg/Kg no mostraron ningún efecto adverso, mientras que aquellos que fueron tratados con una dosis superior (51,3 mg/Kg) sufrieron dolor en el sitio de inyección, emesis, disnea e incluso nefrotoxicidad (36).

### 1.4.2 Apigenina

La apigenina, se conoce químicamente de acuerdo a su nomenclatura IUPAC como 4', 5, 7, -trihidroxiflavona (Figura 8) (37). Es un polvo cristalino amarillo que pertenece a la clase de flavona, y es la aglicona de varios glucósidos de origen natural(37). Es un cristal sólido de color amarillo e insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos como metanol y acetato de etilo (37).

**Figura 8: Estructura química Apigenina**



**Fuente: elaboración propia**

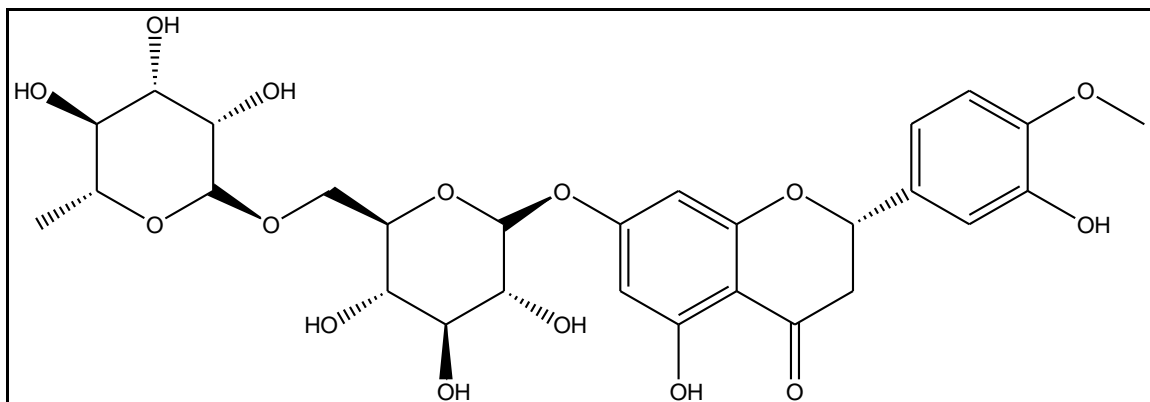
Muchos estudios han revelado que la apigenina tiene varias actividades biológicas, incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, de antígeno genotóxico, antialérgicas, neuroprotectoras, cardioprotectoras y antimicrobianas(38).

### 1.4.3 Hesperidina

El flavonoide hesperidina es un glucósido de flavanona (glucósido) compuesto por la flavanona hesperitina y la disacárido rutinosa (39). Químicamente es conocida según IUPAC como (2S)-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-methiloxano-2-yl]oximetil]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen (Figura9)(40).

Hesperidina es una sustancia sólida con baja solubilidad en agua, sin embargo, es mucho más soluble en agua que su aglicona hesperetina(40). Es un polvo cristalino de color blanco a amarillo(40).

Figura 9: Estructura química Hesperidina



Fuente: elaboración propia

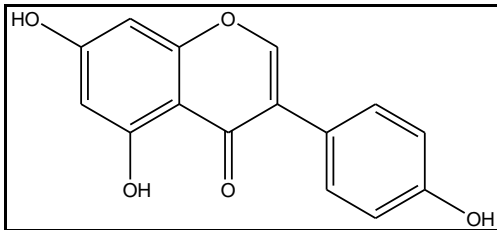
La hesperidina es el flavonoide predominante en limones y naranjas. La cáscara y las partes membranosas de estas frutas tienen las mayores concentraciones de hesperidina, la que se clasifica como cítrico bioflavonoide(39).

Hesperidina exhibe propiedades biológicas variables tales que permiten caracterizarlo como antioxidante, antiinflamatorio, analgésico, anticanceroso, hipolipemiante y eliminador de radicales, (39).

#### 1.4.4 Genisteína

Genisteína es una isoflavona, conocida químicamente según IUPAC (4',5,7) trihidroxiisoflavona (Figura 10)(41). Soluble en los solventes orgánicos usuales; soluble en álcalis y prácticamente insoluble en agua(41). Es un polvo cristalino de color blanco a amarillo(41).

Figura 10: Estructura química Genisteína



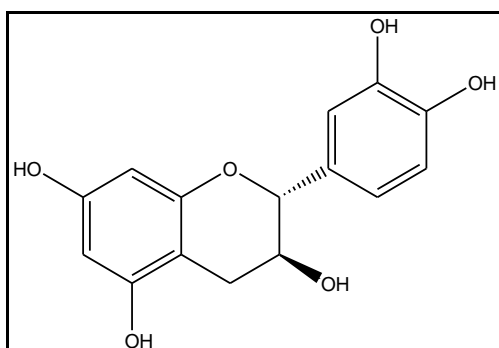
Fuente: elaboración propia

La genisteína es una isoflavona, considerada un fitoestrógeno potente presente por ejemplo en los porotos de la soja (41). La genisteína se une e inhibe la proteína tirosina quinasa, interrumpiendo así la transducción de la señal e induciendo la diferenciación celular. Este agente también inhibe la topoisomerasa-II, lo que lleva a la fragmentación del ADN y la apoptosis, e induce la detención del ciclo celular G2 / M(20) (20). La genisteína exhibe actividades anticancerígenas, antioxidantes, antiangiogénicas e inmunosupresoras(20) (42).

#### 1.4.5 Catequina

Catequina pertenece al grupo de los flavonoles y su fórmula química es 5,7,3',4' tetraoxiflavan-3-ol. (Figura 11) (43). Es un sólido incoloro(44).

**Figura 11: Estructura química Catequina**



**Fuente: elaboración propia**

Estos constituyen la base de los principales grupos de taninos condensados(43). Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes debido a su estructura química, son excelentes donadores de protones o electrones (43) (44).

Debido a todo lo anterior en el laboratorio de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad Andrés Bello, se ha trabajado con la determinación y cuantificación de la familia de flavonoides, con el objeto de ampliar su estudio y generar nuevos conocimientos al respecto.

No obstante, dado que no se han implementado a la fecha, una técnica espectroscópica UV-Vis precisa, para identificar y cuantificar los diferentes tipos de flavonoides presentes en extractos comerciales, es que hemos desarrollado una metodología que nos ayude a identificar los tipos estructurales presentes. Varios extractos que se encuentran en Chile no poseen una rotulación correcta en cuanto a la cantidad y tipo de flavonoides que ellos contienen. Por lo cual, este trabajo cobra mayor importancia al aplicar la metodología implementada a extractos comerciales y fitofármacos.

**HIPÓTESIS**



## **2. HIPÓTESIS**

En un extracto vegetal, es posible identificar y diferenciar las estructuras flavónicas presentes, mediante la técnica espectroscopía UV-Vis.

## **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Implementar una metodología de trabajo para la identificación de metabolitos secundarios de naturaleza flavónica mediante espectroscopía UV-Vis.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Implementar la técnica de espectroscopía UV-Vis para diferentes estándares de flavonoides.
- Aplicar la metodología de identificación de estructuras tipo flavonoide mediante el corrimiento de las bandas I y II en el espectro UV-vis.
- Aplicar la metodología desarrollada a un extracto vegetal rico en flavonoides.

## **METODOLOGÍA**

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Reactivos, equipos y materiales**

#### **4.1.1 Reactivos**

- Tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), Merck®
- Estándar apigenina  $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich®
- Estándar  $\pm$  (-) catequina hidrato  $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich®
- Estándar genisteína  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich®
- Estándar hesperidina  $\geq 80\%$ , Sigma-Aldrich®
- Estándar quercetina  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich®
- Etanol para análisis (p.a), ISN
- Cápsula ajo comercial
- Cápsula matico comercial
- Metanol para análisis (p.a), Merck

#### **4.1.3 Materiales y Equipos**

- Balanza Analítica Radwag AS 220/C/2
- Cronómetro
- Cubetas de cuarzo
- Cubetas de vidrio
- Espátula
- Espectrofotómetro Orion 8000 UV-Vis
- Matraz aforado 10 mL, 25 mL y 100 mL
- Matraz Erlenmeyer 25 mL
- Micropipeta Gilson p-1000 y p-200
- Pipeta aforada 10 mL
- Probeta de 100 mL

- Sonicador Elmasonic E 60H
- Vasos precipitados de 50 mL, 150 mL y 250 mL.

#### **4.1.4 Preparación de Reactivos**

- Etanol 80%
- Solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en etanol p.a.
- Solución de  $\text{AlCl}_3$  al 5% en metanol p.a
- Soluciones apigenina 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL
- Soluciones catequina 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL
- Soluciones genisteína 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL
- Soluciones hesperidina 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL
- Soluciones quercetina 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL
- Solución cápsula ajo, extracto seco 3 mg/mL
- Solución cápsula matico, extracto seco 2 mg/mL

#### **Solución de etanol al 80% V/V**

Se midieron 80 mL en probeta aforada y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Finalmente, se completó volumen hasta aforo con agua destilada.

#### **Solución madre de apigenina 0,05 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 5 mg de estándar de apigenina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 25 mL de etanol al 80 %V/V y se sonicó por 1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 100 mL con etanol al 80% V/V

#### **Solución madre de apigenina 0,01 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 1 mg de estándar de apigenina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 3 mL de metanol y se sonicó por

1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 10 mL con etanol al 80%V/V.

#### **Solución madre de catequina 0,05 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 5 mg de estándar de catequina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 25 mL de etanol al 80 % V/V y se sonicó por 2 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 100 mL con etanol al 80% V/V.

#### **Solución madre de catequina 0,01 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 1 mg de estándar de apigenina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 3 mL de metanol y se sonicó por 30 segundos para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 10 mL con etanol al 80% V/V.

#### **Solución madre de genisteína 0,05 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 5 mg de estándar de genisteína y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 25 mL de etanol al 80 % V/V y se sonicó por 2 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 100 mL con etanol al 80% V/V.

#### **Solución madre de genisteína 0,01 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 1 mg de estándar de apigenina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 3 mL de metanol y se sonicó por 1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 10 mL con etanol al 80% V/V.

### **Solución madre de hesperidina 0,05 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 5 mg de estándar de hesperidina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 25 mL de etanol al 80 % V/V y se sonicó por 1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 100 mL con etanol al 80% V/V.

### **Solución madre de hesperidina 0,01 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 1 mg de estándar de apigenina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 3 mL de metanol y se sonicó por 1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 10 mL con etanol al 80%.

### **Solución madre de quercetina 0,05 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 5 mg de estándar de quercetina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 25 mL de etanol al 80 % V/V y se sonicó por 1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 100 mL con etanol al 80% V/V.

### **Solución madre de quercetina 0,01 mg/mL**

Se pesaron en balanza analítica 1 mg de estándar de quercetina y fue llevado a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 3 mL de metanol y se sonicó por 1 minuto para disolver. Finalmente, se llevó a aforo de 100 mL con etanol al 80% V/V.



### **Solución etanólica de $\text{AlCl}_3$ 2%**

Se pesaron en balanza analítica 2 g de  $\text{AlCl}_3$  anhidro, luego se llevó a un matraz de aforo de 100 mL. Se agregó de manera lenta y cuidadosa el etanol hasta llegar a volumen 100 mL. Finalmente, se disolvió después de 24 horas.

### **Solución metanólica de $\text{AlCl}_3$ 5%**

Se pesaron en balanza analítica 5 g de reactivo  $\text{AlCl}_3$  anhidro, luego se llevó a un matraz de aforo de 100 mL. Posteriormente, se agregó con cautela al metanol hasta llegar a aforo de 100 mL. Finalmente, se disolvió después de aproximadamente 24 horas.

### **Solución etanólica a partir de extracto seco de cápsula de ajo**

Se tomaron 313 mg de extracto seco ajo de las cápsulas y se llevaron a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 40 mL de etanol al 80% V/V, para disolver fue llevado a sonicador por 5 minutos. Finalmente, se aforó a 100 mL con etanol al 80% V/V para obtener una solución.

### **Solución metanólica a partir de extracto seco de cápsula de ajo**

Se pesaron 300 mg de extracto seco ajo de las cápsulas y se trasvasaron a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 40 mL de metanol y fue llevado a sonicador por 3 minutos hasta disolución. Finalmente se aforó a 100 mL con metanol.

### **Solución etanólica a partir de extracto seco de cápsula matico**

Se pesaron 200 mg de extracto seco ajo de las cápsulas y se trasvasaron a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 40 mL de etanol al 80% V/V, para disolver fue llevado a sonicador por 10 minutos. Finalmente, se aforó a 100 mL con etanol al 80% V/V.

### **Solución metanólica a partir de extracto seco de cápsula matico**

Se pesaron 200 mg de extracto seco ajo de las cápsulas y se trasvasaron a un matraz de aforo de 100 mL. Luego se agregó 40 mL de metanol y fue llevado a sonicator por 4 minutos hasta disolución. Finalmente se aforó a 100 mL con metanol.

## **4.2 Cuantificación e identificación de flavonoides totales**

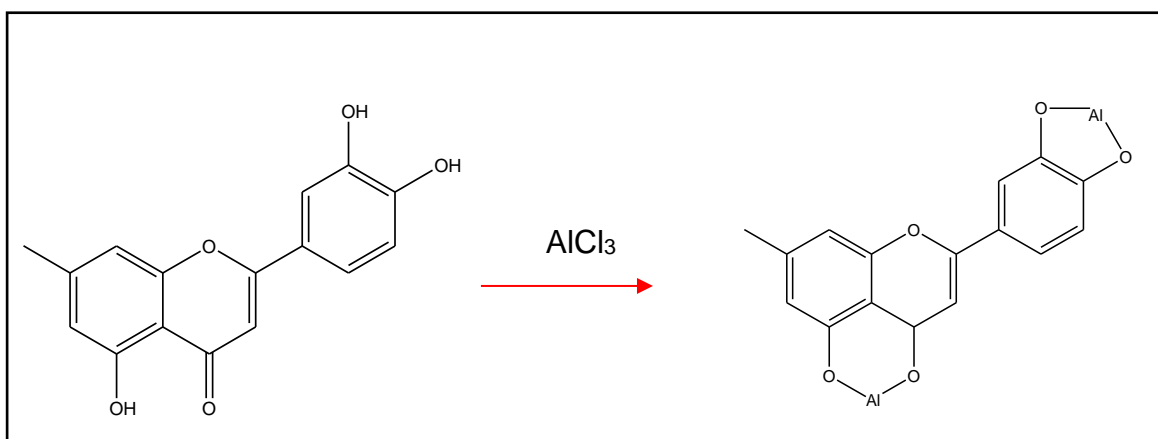
Para analizar el contenido de flavonoides presentes en una muestra, se utiliza un espectrofotómetro UV-VIS Orion AquaMate 7000 & 8000, el cual emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo específico de longitudes de onda. Una lámpara de tungsteno suministra la radiación visible y otra de arco deuterio, la ultravioleta.(45)

### **4.2.1 Determinación de flavonoides totales**

Para realizar la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos se utilizará el método de Kumazawa(46). En esta prueba los flavonoides reaccionan con el cloruro de aluminio en etanol produciendo un complejo de color amarillo que posee un pico de absorción de 420-425 nm(32) (47).

Los flavonoides actúan fundamentalmente como “tampones”, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados. Los flavonoides, desde el punto de vista reactivo forman complejos estables con el tricloruro de aluminio (Figura 12). De esta forma pueden quelar iones metálicos de transición como el aluminio, evitando así la formación de las especies reactivas de oxígeno producidas. Finalmente dichos complejos son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría UV-visible(48).

Figura 12: Formación de complejo flavonoide- $\text{AlCl}_3$



Fuente: elaboración propia

### Preparación de las curvas de calibración de los estándares de Flavonoides

(49) (50) (51) (52) (53) (54) (55): Se realizó una curva de calibrado de estándar flavonoide entre el rango de 5  $\mu\text{g/mL}$  A 50  $\mu\text{g/mL}$ .

La solución madre se preparó pesando 5 mg de estándar en 100 mL de etanol al 80% V/V, obteniendo una concentración 0,05 mg/mL. Las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas de la dilución realizada desde la solución madre son: 5-10-25-50. (Tabla 5). Etanol al 80 % V/V se utilizó como blanco.

Tabla 5: Concentraciones de soluciones para curva de calibrado.

Concentración final Solución flavonoide ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen Final (mL).	Concentración estándar flavonoide ( $\mu\text{g/mL}$ )	Alícuota solución flavonoide estándar (mL)
5	10	50	1
10	10	50	2
25	10	50	5
50	10	50	10

Fuente: elaboración propia

Luego, las 4 soluciones se midieron a diferentes longitudes de onda según el tipo de flavonoide a analizar (Tabla 6) (Tabla 7)

**Tabla 6: Longitudes de onda para los diferentes estándares de flavonoides a estudiar y celdas espectrofotométricas para cada una de estos.**

Tipo de Flavonoide	Quercetina (49)	Catequina (50) (51) (52)	Genisteína (53)	Hesperidina (54)	Apigenina (56)
Longitud de Onda ( $\lambda$ ) (nm)	420	274	382	285	269
Tipo Celda 1 cm	Vidrio	Cuarzo	Cuarzo	Cuarzo	Cuarzo

Fuente: elaboración propia

**Tabla 7: Longitudes de onda para las diferentes muestras de estudio y celdas espectrofotométricas para cada una de estos.**

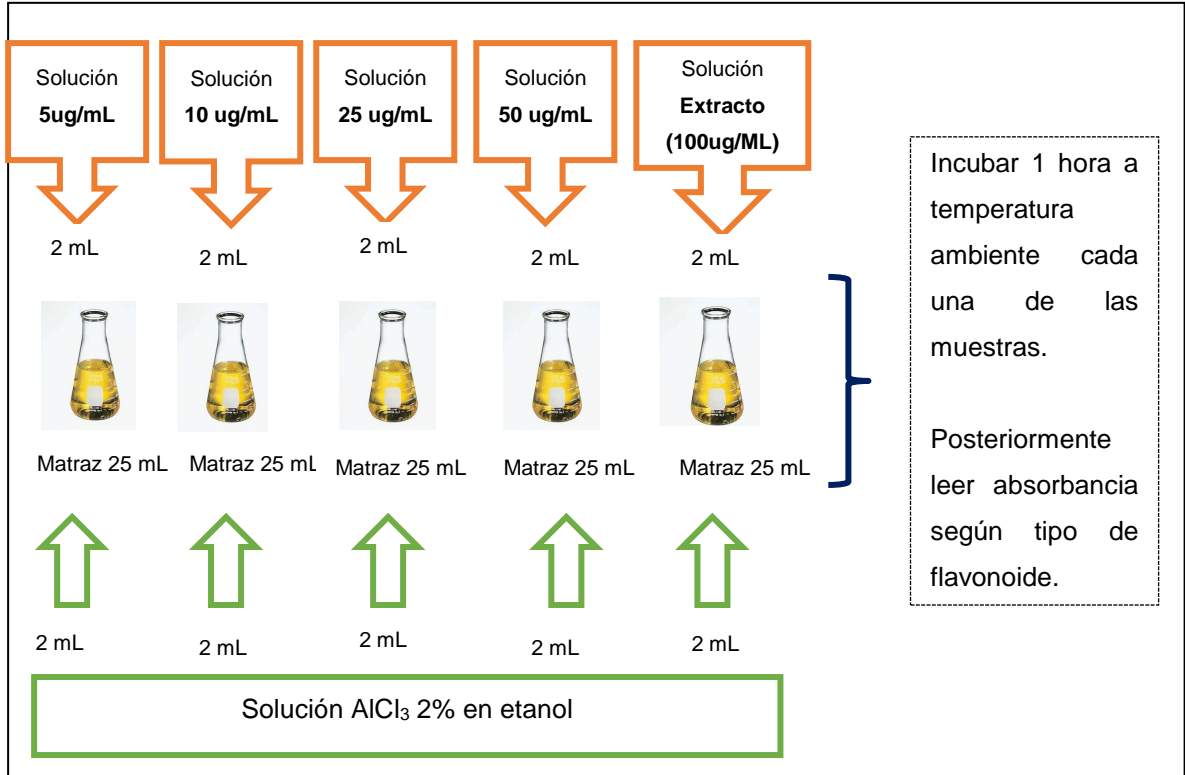
Tipo de Flavonoide	Cápsula Ajo	Cápsula Matico
Longitud de Onda ( $\lambda$ ) (nm)	420	274
Tipo Celda 1 cm	Vidrio	Cuarzo

Fuente: elaboración propia

### **Cuantificación de flavonoides totales**

Para la cuantificación, se extrajeron 2 mL de cada una de las soluciones de la curva de calibrado estándar y la solución de muestra extracto seco se llevó a un matraz Erlenmeyer de 25 mL. Posteriormente, a cada una de las soluciones se le agregó 2 mL de  $AlCl_3$  2% en etanol. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se llevó a espectrofotómetro para leer absorbancia (Figura 13). Cada muestra se llevó a leer por sextuplicado.

Figura 13: Diagrama Cuantificación flavonoide total



Fuente: elaboración propia

El contenido de flavonoides totales se determinó por regresión lineal ( $n=4$ ) mediante el análisis de la curva de calibración de flavonoide obtenida. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina y catequina (QE)/g extracto seco  $\pm$  DS. Este procedimiento se efectuó con cada una de la muestra objeto de estudio, por sextuplicado.

### Evaluación de parámetros de desempeño analítico.

De acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio se evaluaron parámetros imprescindibles para la implementación de la técnica espectrofotométrica para así, cumplir los requerimientos analíticos correspondientes a lo exigido por ISP (57).

Los parámetros analíticos determinados fueron los siguientes:

- Linealidad
- Exactitud
- Precisión
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

La precisión se estableció en términos de repetibilidad y reproducibilidad, se calculó como desviación estándar ( $DS \pm 0,001$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación (CV%) que no fuese superior a 2 %.

#### **4.2.2 Identificación de flavonoides**

El ensayo espectrofotométrico basado en la formación de complejo flavonoide- $AlCl_3$  genera un desplazamiento batocrómico y efecto hiperocrómico, siendo uno de los procedimientos más comúnmente utilizados para la identificación de estructuras de flavonoides(58) (59).

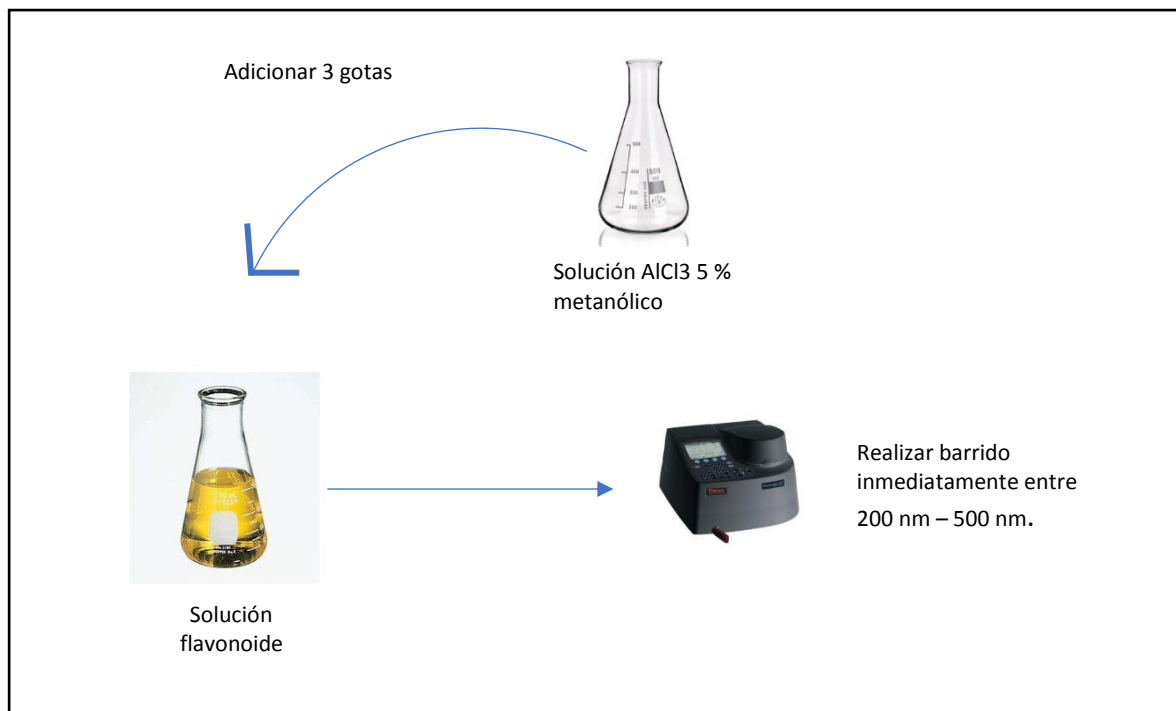
Espectro UV-Visible de cada compuesto se determinó en metanol y después de la adición de reactivo de cambio tales como  $AlCl_3$ , realizando un barrido entre 200-500 nm(60). El  $AlCl_3$  permite la identificación de flavonoides y cumarinas, los que se caracterizan por presentar fluorescencia al espectro de luz UV, ya que los flavonoides se intensifican o cambian de coloración amarillo verdoso(61).

Las mediciones de los diferentes estándares de flavonoides se realizaron en una celda de cuarzo y vidrio de 1 cm. de paso óptico según corresponda. Por conveniencia, el metanol espectroscópico sin reactivo se utilizará como referencia.

La solución madre del flavonoide a estudiar se preparará disolviendo una pequeña cantidad del compuesto 1 mg en 100 mL de metanol para análisis. A continuación, se ajustó la concentración de forma que la densidad óptica del pico principal de absorción entre 200 y 420 nm tenga una lectura de la densidad óptica (DO) en la región de 0,6 a 0,9 para todos los estándares y muestras de estudio de este trabajo (12) (49).

El espectro de  $AlCl_3$  se medirá inmediatamente después de la adición de seis gotas de la solución madre de  $AlCl_3$  5% metanólico a 2 mL de la solución madre del estándar o muestra de estudio. En caso de ser isoflavonas o dihidroflavonoles se requiere alrededor de un minuto para que el reactivo  $AlCl_3$  5% metanólico produzca su efecto máximo en el espectro UV(12) (19) (Figura 14).

**Figura 14: Esquema identificación de flavonoides**



Fuente: elaboración propia

## **RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cuantificación de flavonoides totales

Para determinar la cantidad de flavonoides totales en las muestras de estudio ajo y matico, fue necesario establecer una curva de calibración (62), para cada uno de los 5 tipos de estándares de flavonoides utilizados como patrones primarios, quercetina, catequina, hesperidina, apigenina y genisteína, obteniéndose la correspondiente ecuación de la recta (62). Los resultados de estas mediciones se muestran en los Anexos 1 al 10.

Ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

donde:

$y$  = Absorbancia

$m$  = Pendiente

$x$  = Concentración flavonoide expresados en  $\mu\text{g/mL}$

$b$  = Intercepto

Las absorbancias, se midieron a distintas longitudes de onda de acuerdo con el tipo de flavonoide estudiado. Cada determinación se realizó por sextuplicado.

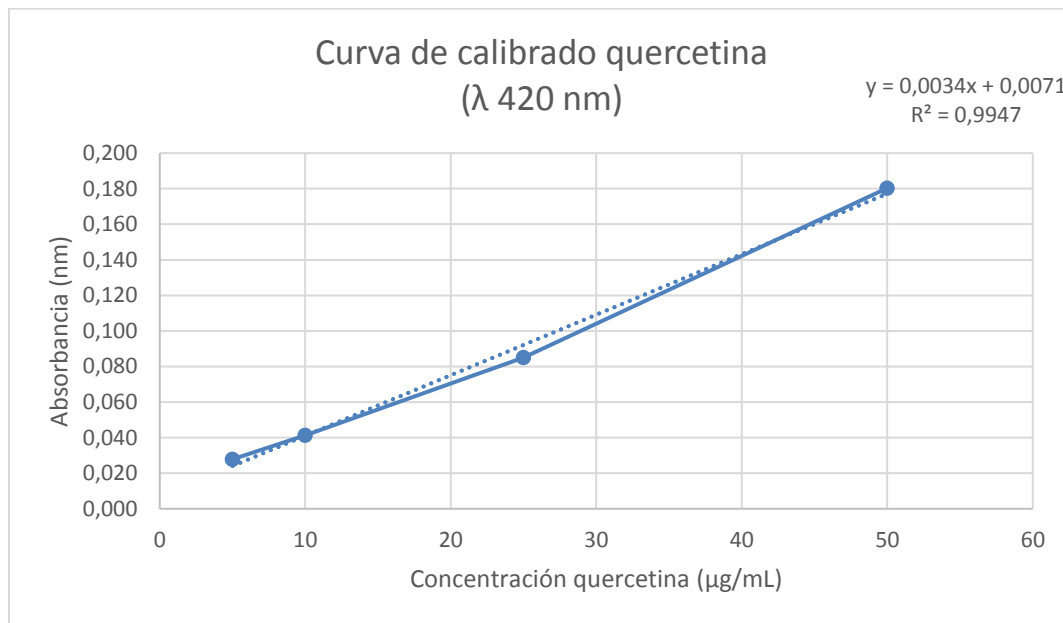
#### 5.1.1 Obtención de las gráficas de calibración de los estándares de flavonoides en etanol

En cada curva de calibrado se evaluó su linealidad y el coeficiente de determinación, ya que este coeficiente determina la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de estos. Además, las diferentes curvas de calibrado realizadas fueron determinadas a la longitud de

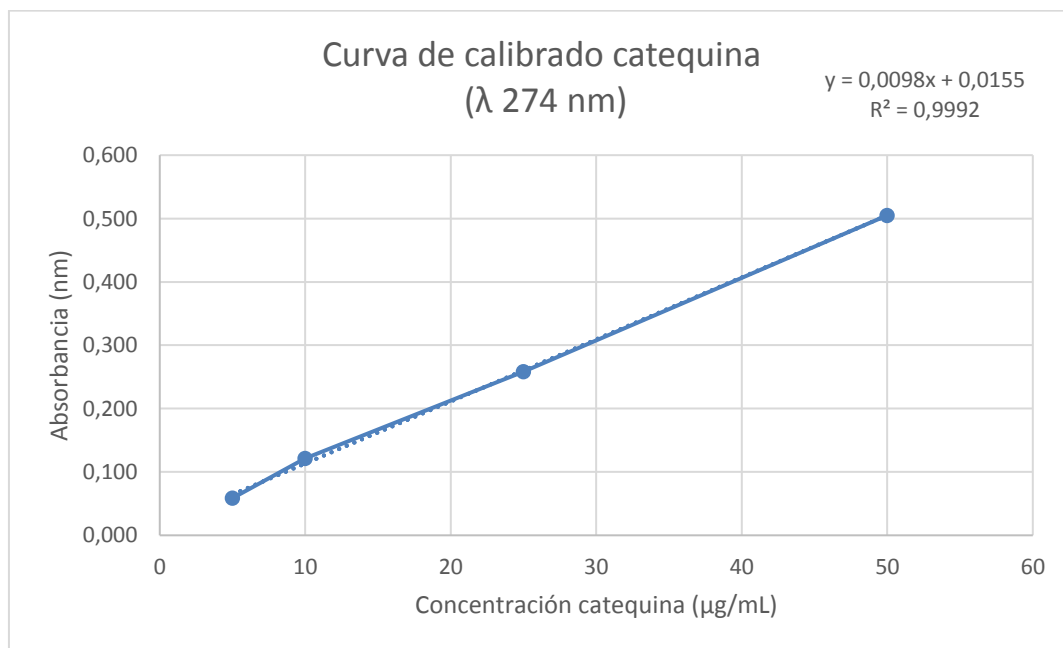
onda correspondiente al tipo de flavonoide (Figura 15). Las curvas se realizaron con un n=4, ya que es un método en desarrollo y así la variabilidad fue mínima y el intervalo lineal fue fiable.

**Figura 15: Gráficas de curvas de calibrado de los estándares de flavonoide analizados. (A) quercetina; (B) catequina; (C) hesperidina; (D) genisteína y (E) apigenina.**

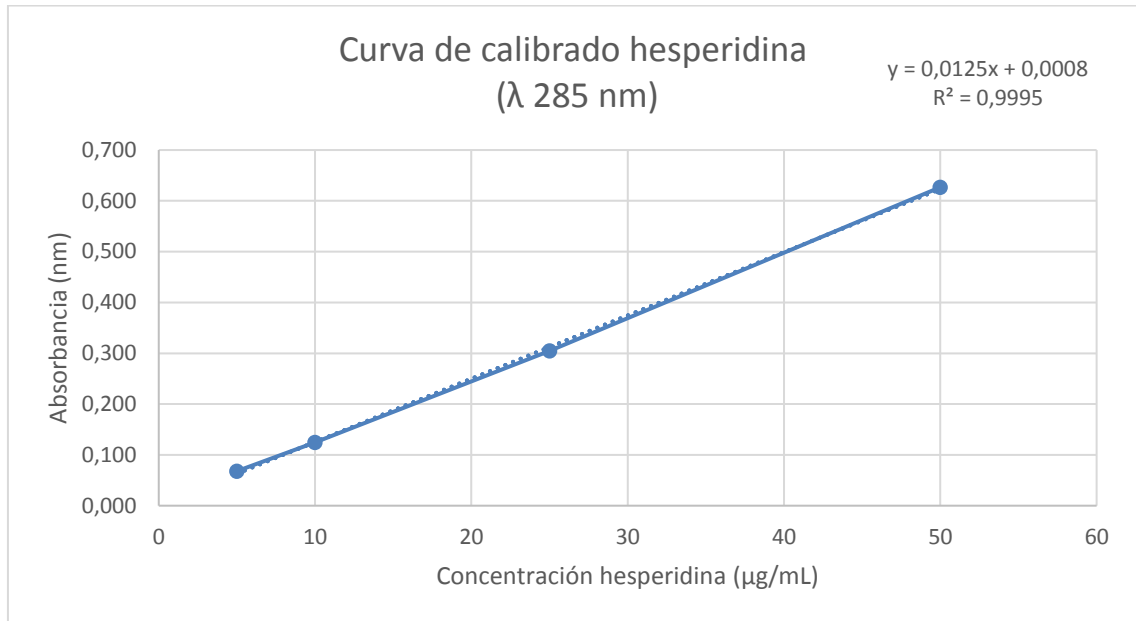
(A)



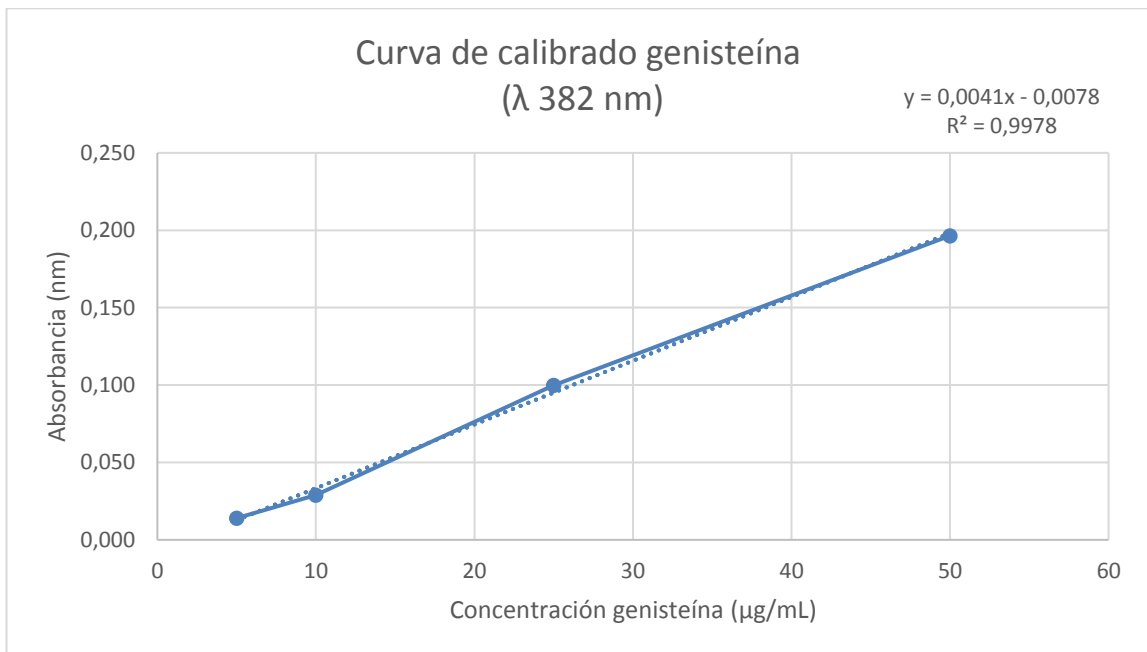
(B)



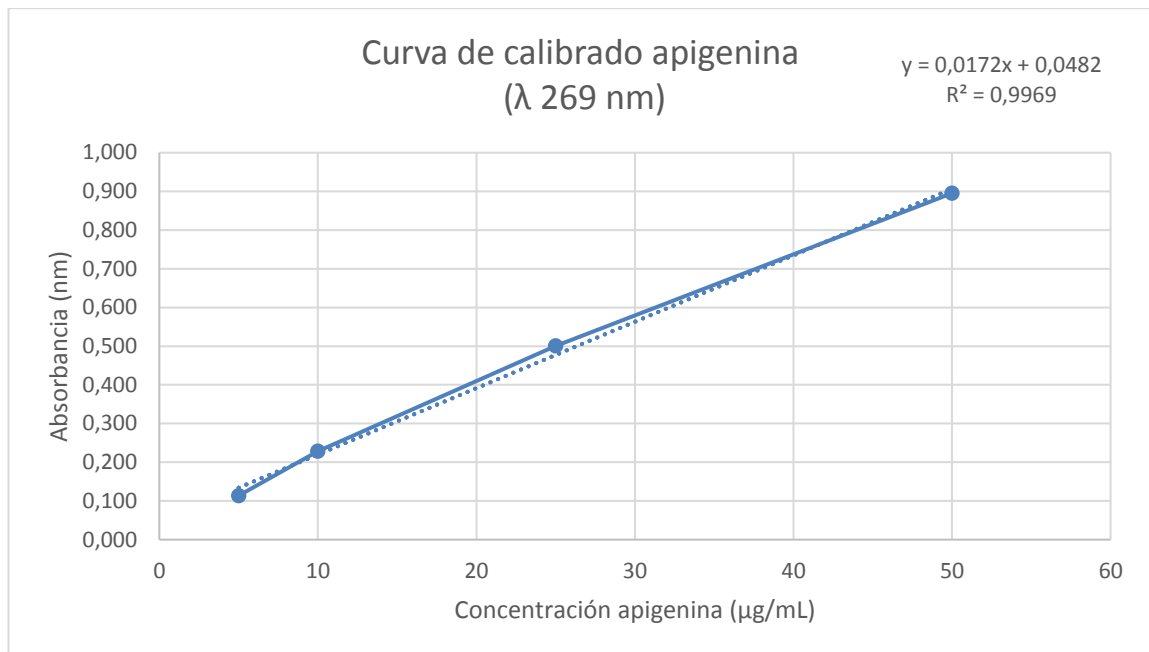
(C)



(D)



(E)

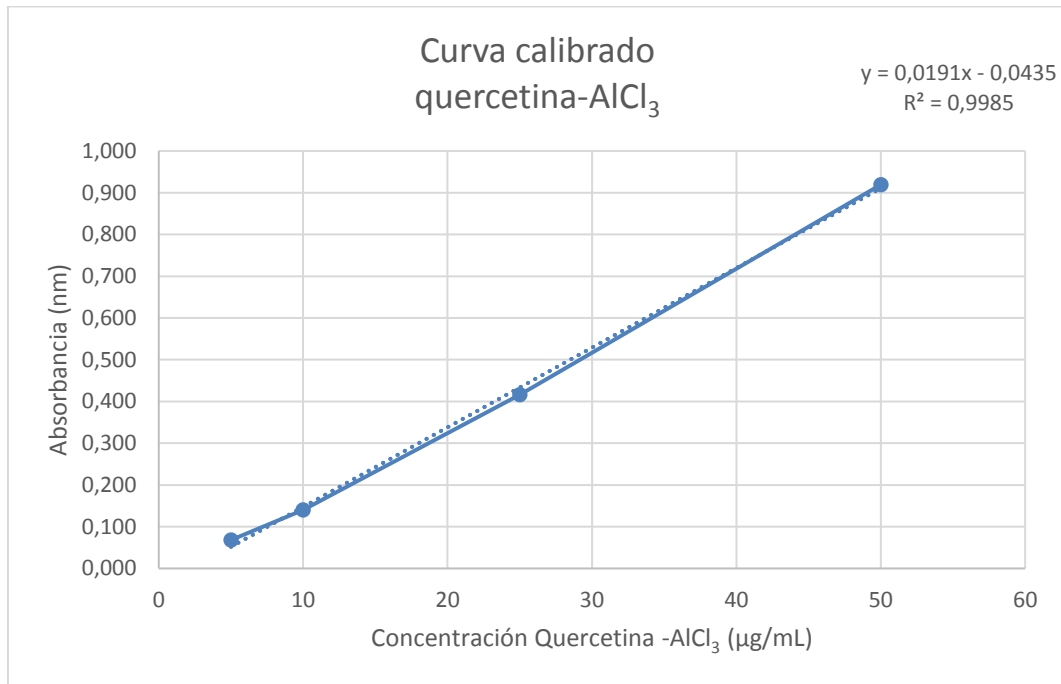


### 5.1.2 Obtención de las gráficas de calibrado de los estándares de flavonoides en $AlCl_3$ 2% etanólico.

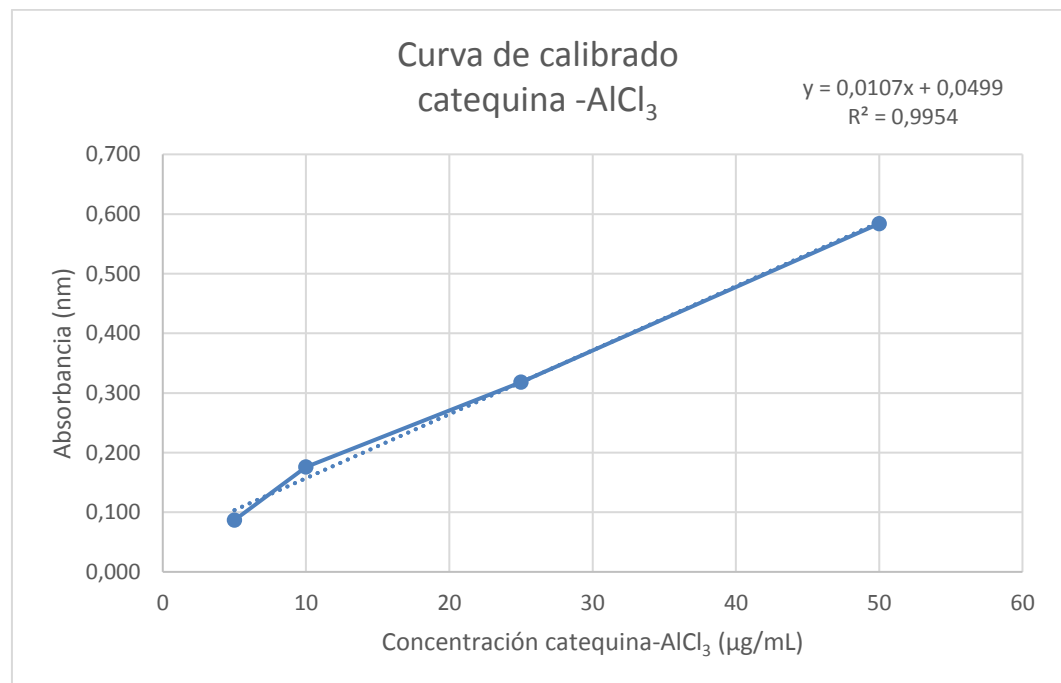
Los resultados indicaron que al adicionar  $AlCl_3$  2% etanólico y medir después de 1 hora la absorbancia, la curva de calibrado se desplaza hacia arriba (Figura 16). La curva se realizó con  $n=4$ , para evaluar la linealidad y el coeficiente de determinación.

Figura 16: Gráfica curva de calibrado estándar de flavonoide en  $\text{AlCl}_3$  2 % etanólico. (A) quercetina; (B) catequina; (C) hespridina; (D) genisteína y (E) apigenina.

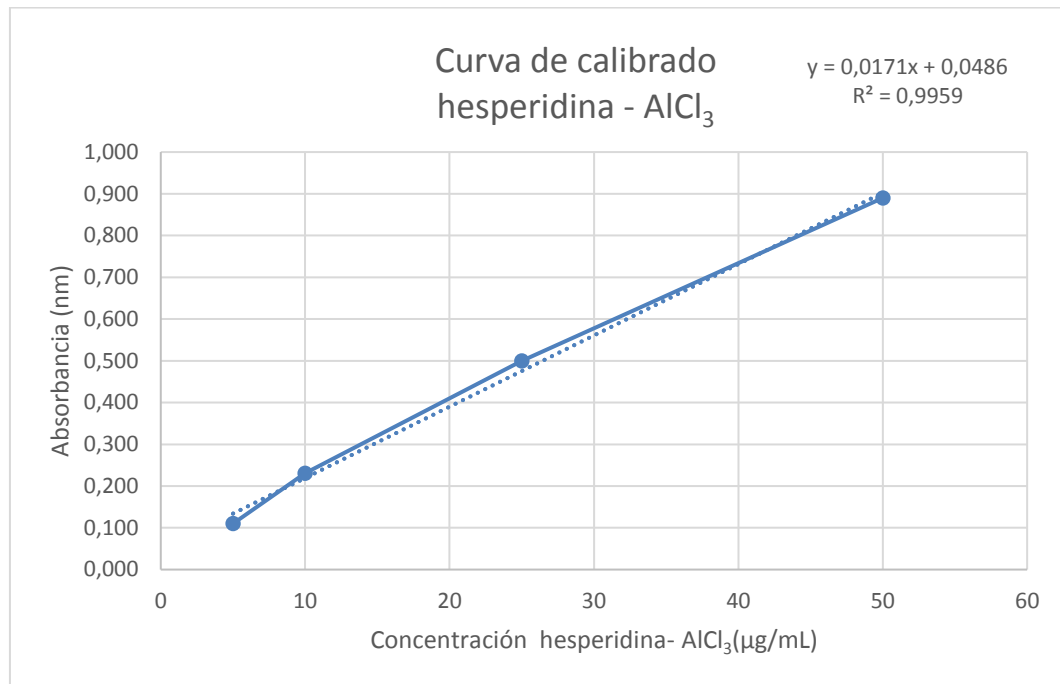
(A)



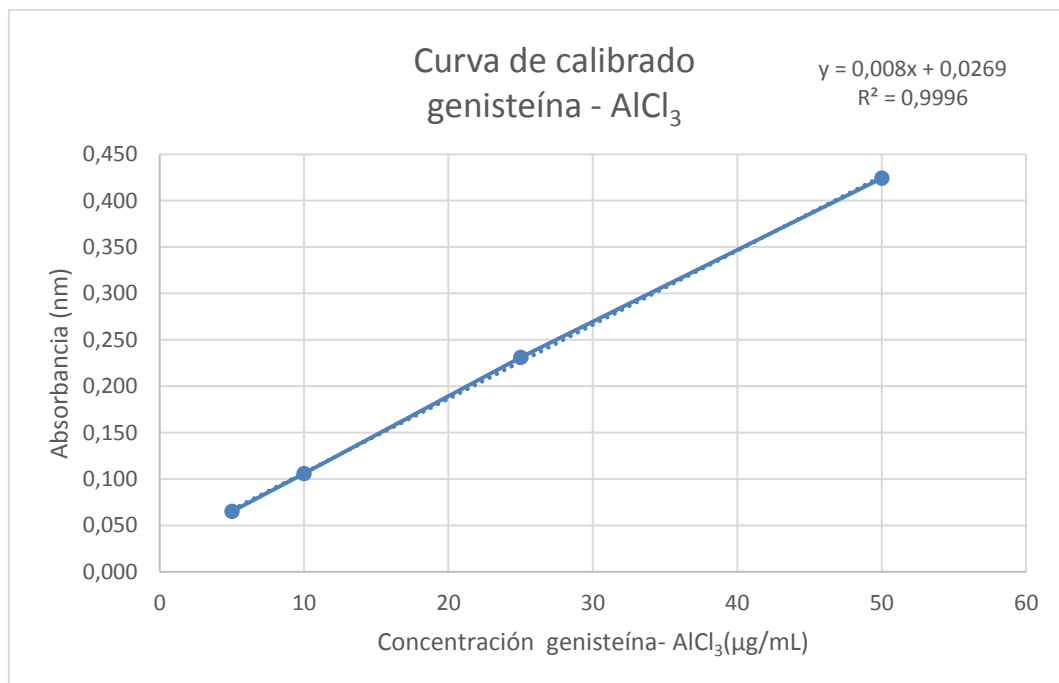
(B)



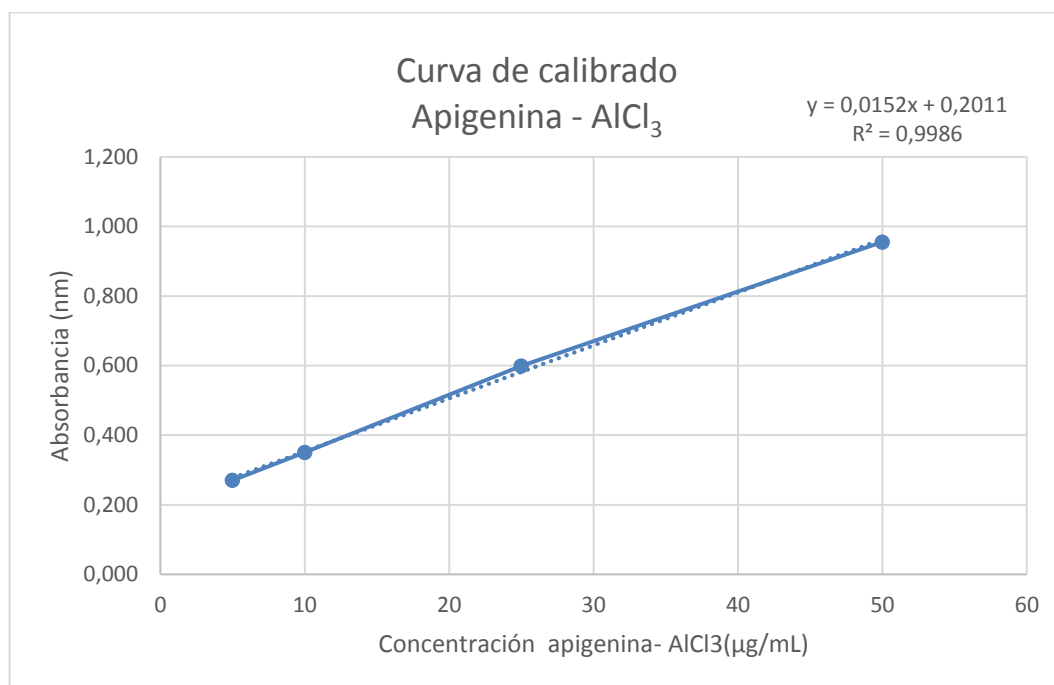
(C)



(D)



(E)



### 5.1.3 Contenido de flavonoides en cápsulas de ajo y de matico

El contenido de flavonoides de los extractos se muestra en la tabla 8 y tabla 9 y son expresados como mg equivalentes de quercetina (QE) y catequina (CA) por gramo de extracto seco. Las mediciones de las absorbancias y los parámetros estadísticos de muestran en los Anexos 11-14.

Tabla 8: Resultados obtenidos en la determinación de flavonoides totales de extracto de ajo, mediante el método de Kumazawa, expresados como la media de 6 resultados  $\pm$  desviación estándar.

Flavonoides totales cápsula ajo		
Extracto	(mg QUE/g extracto seco $\pm$ SD)	(mg QUE/100g extracto seco $\pm$ SD)
Ajo-etanol	12,39 $\pm$ 0,0008	1238,17 $\pm$ 0,08
Ajo-etanol AlCl <sub>3</sub>	7,72 $\pm$ 0,0010	771,96 $\pm$ 0,10

Fuente: elaboración propia

**Tabla 9: Resultados obtenidos en la determinación de flavonoides totales de extracto de matico, mediante el método de Kumazawa, expresados como la media de 6 resultados  $\pm$  desviación estándar.**

Flavonoides totales cápsula matico		
Extracto	(mg CA/g extracto seco $\pm$ SD)	(mg CA/100gr extracto seco $\pm$ SD)
Matico-etanol	9,92 $\pm$ 0,008	992,19 $\pm$ 0,08
Matico-etanol AlCl <sub>3</sub>	10,71 $\pm$ 0,001	1070,56 $\pm$ 0,01

Fuente: elaboración propia

Donde se observa que el contenido de flavonoides totales de los extractos obtenidos para cápsula de ajo osciló entre 7,72 y 12,39 mg QE / g extracto seco y para cápsula de matico entre 9,92 y 10,71 mg CA / g extracto seco.

Los resultados obtenidos revelan que, para cápsula de ajo, el contenido de flavonoides totales es mayor en el extracto de etanol 12,3851 mg QE/g extracto seco, mientras que en cápsula de matico el mayor contenido de flavonoides se presentó en el extracto de etanol-AlCl<sub>3</sub> 10,7056 mg CA/g extracto seco. Por otra parte, el menor contenido de flavonoides totales en cápsula de ajo se obtuvo en el extracto etanol-AlCl<sub>3</sub> 7,72 mg QE/g extracto seco, mientras que en cápsula matico el extracto con menor contenido de flavonoides fue el etanólico 9,92 mg CA/g extracto seco.

Las curvas de calibrado y los análisis tanto para muestras de cápsulas como para los patrones, fueron realizados por sextuplicado evaluándose parámetros estadísticos cuantitativos como linealidad, pendiente, precisión, desviación estándar y coeficiente de variación. El coeficiente de variación no fue superior al 2% indicando un rango de precisión y de sensibilidad adecuado, ya que cuanto menor es el porcentaje de este coeficiente mayor será su linealidad. Los valores de linealidad obtenidos estuvieron entre 0,9947 a 0,9996 lo que es muy cercano al valor 1. La repetibilidad y reproducibilidad fue evaluada durante 3 días continuos con 2 mediciones diarias. En cuanto a las pruebas para precisión y exactitud, estas fueron realizadas con desviaciones estándar  $\pm$  0,001.



## 5.2 Identificación de flavonoides.

Los espectros de absorción de los distintos tipos de flavonoides y las muestras de estudio se midieron mediante un espectrómetro UV-Vis en el rango espectral de 200 a 420 nm. Los espectros se registraron a una velocidad lenta de barrido de 0,1 nm por segundo y realizándose primero el espectro metanólico y luego el metanólico- $\text{AlCl}_3$ . Cada dato de estas actividades experimentales se encontró a partir de un registro computarizado con el espectrómetro Orion 8000 UV-Vis.

Para el ajuste de concentración de cada uno de los tipos de flavonoides se preparó una solución inicial que se muestra en la tabla 10.

**Tabla 10: Concentraciones de soluciones estándar de flavonoides para corrimiento de bandas.**

Tipo	Quercetina estándar	Catequina estándar	Genisteína estándar	Hesperidina estándar	Apigenina estándar
mg	1	1	1	1	1
mL	100	100	100	100	100
Concentración (mg/mL)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Fuente: elaboración propia

Luego, se realizó un barrido de cada una de las soluciones preparadas entre 200 y 420 nm (Anexo 15), y se determinaron los picos de absorción máximo de cada uno de los estándares en espectro metanólico.

Finalmente, se realizó nuevamente un ajuste de concentración de las soluciones (Tabla 11) para obtener una absorbancia entre 0,6 y 0,9 ABS en los picos de los distintos flavonoides en los barridos realizados en espectro metanólico (anexo 16).

**Tabla 11: Ajuste de concentración de las soluciones flavonoides**

Tipo	Quercetina estándar	Catequina estándar	Genisteína estándar	Hesperidina estándar	Apigenina estándar
Concentración (mg/mL)	0,005	0,0025	0,0025	0,01	0,008

Fuente: elaboración propia

En cuanto al espectro con metanol- $\text{AlCl}_3$ , se realizó un barrido con las concentraciones ajustadas de los estándares y se obtuvieron los máximos de absorción entre 0,6- 0,9 ABS (anexo 17).

Para las muestras de estudio, cápsula de ajo y cápsula de matico se prepararon las siguientes soluciones que fueron las que se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12: Concentraciones obtenidas para las soluciones de los extractos secos analizados**

	Cápsulas Ajo	Cápsulas matico
Concentración (mg/mL)	3,13	2

Fuente: elaboración propia

Luego se determinaron sus máximos de absorbancia entre el rango de longitud de onda entre 200 y 420 nm (anexo 18).

De acuerdo con todo lo anterior, los estándares de flavonoides mostraron los picos característicos en las bandas I y II en espectro metanólico como muestra la figura 17 en las siguientes absorbancias (Tabla 13).

Figura 17: Intensidades de las bandas I y II observadas en el análisis de los estándares de flavonoides.

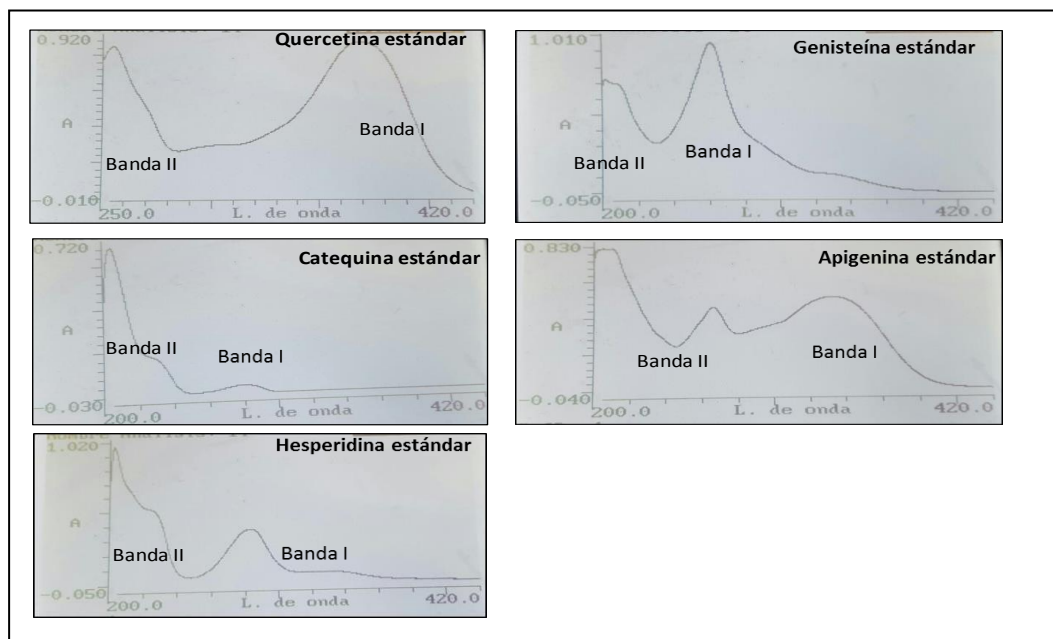


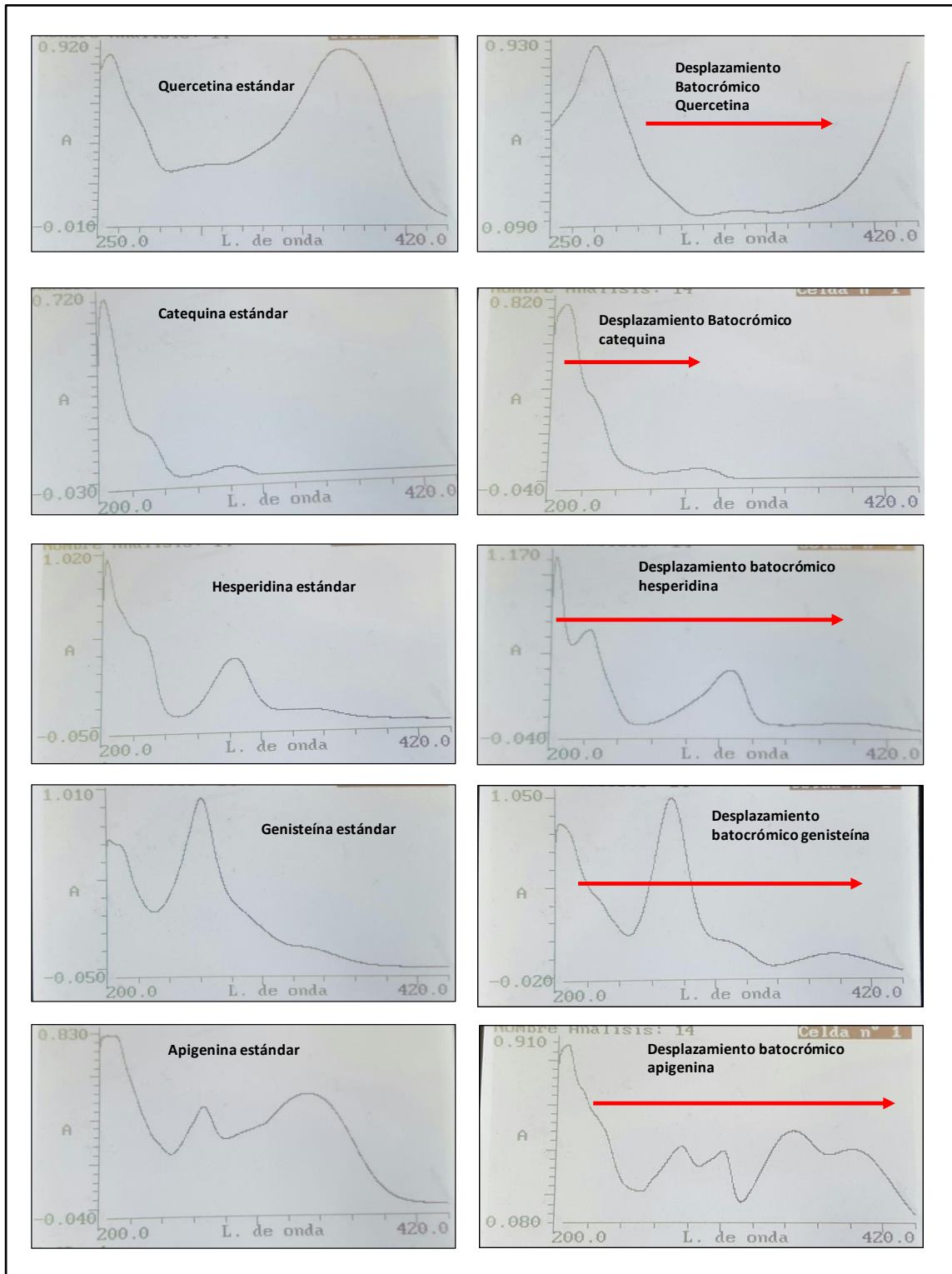
Tabla 13: Valores asociados a los máximos de las Banda I y II mostradas en el espectro metanólico para los distintos estándares.

Estándar	Banda I	Banda II
Quercetina	0,902	0,798
Catequina	0,100	0,703
Hesperidina	0,469	0,978
Genisteína	0,952	0,474
Apigenina	0,520	0,799

Fuente: elaboración propia

Luego, al cambiar al espectro metanol- $\text{AlCl}_3$ , se mostró un desplazamiento Batocrómico en los distintos estándares (Figura 18), mostrando las siguientes absorbancias en el espectro metanólico- $\text{AlCl}_3$  en los distintos estándares en los máximos de cada banda (Tabla 14).

Figura 18: Espectrograma UV-vis mostrando el corrimiento de las bandas observadas en el análisis de los estándares de flavonoides, sin y con exposición a  $AlCl_3$  (indicada con la flecha roja).



**Tabla 14: Valores asociados a los máximos de las Banda I y II mostradas en espectro metanólico-AICl<sub>3</sub> en los distintos estándares.**

Estándar	Banda I	Banda II	Desplazamiento
Quercetina	0,890	0,910	Batocrómico
Catequina	0,078	0,811	Batocrómico
Hesperidina	0,486	0,997	Batocrómico
Genisteína	0,970	0,563	Batocrómico
Apigenina	0,611	0,897	Batocrómico

Fuente: elaboración propia

Las longitudes de onda de máxima absorbancia en cada estándar y en los diferentes espectros se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15: Longitud de onda máxima absorbancia en los distintos estándares de flavonoides.**

Estándar	Longitud de onda máxima espectro metanol	Longitud de onda máxima espectro metanol-AICl <sub>3</sub>
Quercetina	375	410
Catequina	281	290
Hesperidina	279	300
Genisteína	242	261
Apigenina	222	225

Fuente: elaboración propia

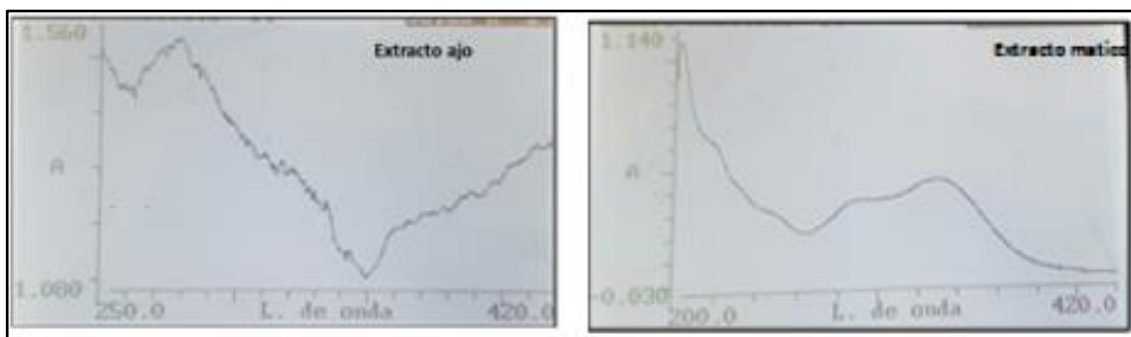
En cuanto a las muestras de estudio de cápsula de ajo y matico se observaron las siguientes absorbancias en espectro metanólico (Tabla 16) y los siguientes espectrogramas mostrados en la figura 19.

**Tabla 16: Valores asociados a los máximos de las Banda I y II mostradas en espectro metanólico en las cápsulas.**

Muestra	Banda I	Banda II
Cápsula ajo	0,997	0,953
Cápsula matico	0,734	1,129

Fuente: elaboración propia

Figura 19: Espectrograma UV-Vis mostrando el corrimiento de los extractos vegetales de ajo y matico respectivamente.



Al cambiar al espectro metanol- $\text{AlCl}_3$ , se observaron desplazamientos batocrómicos en ambas cápsulas en la banda I y banda II como muestra la tabla 17 y la figura 20.

Tabla 17: Valores asociados a los máximos de las Banda I y II mostradas en espectro metanólico- $\text{AlCl}_3$  en las distintas cápsulas.

Estándar	Banda I	Banda II	Desplazamiento
Cápsula ajo	0,501	0,920	Batocrómico
Cápsula matico	0,620	1,150	Batocrómico

Fuente: elaboración propia

Las longitudes de onda de máxima absorbancia en cada cápsula y en los diferentes espectros se mostraron en la tabla 18.

Según estos datos, el extracto seco de ajo presentó un espectrograma con longitudes de onda cercanas al estándar de quercetina. En cuanto a al extracto de matico se observa un espectrograma similar a catequina, apigenina y quercetina. Esto indica que en el extracto seco de la cápsula de matico están presentes varios tipos de flavonoides. En cambio, en las cápsulas de extracto seco de ajo se pudo apreciar que presenta quercetina como el principal flavonoide.

Figura 20: Espectrograma UV-vis mostrando el corrimiento de las bandas I y II observadas en el análisis de los extractos vegetales ajo y matico, sin y con exposición a  $\text{AlCl}_3$  (indicada con la flecha roja).

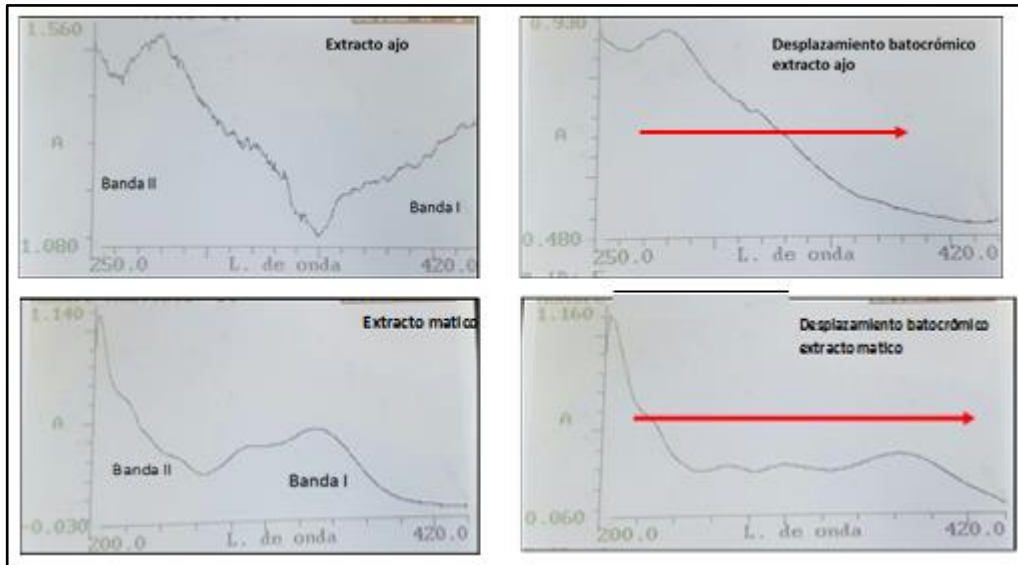


Tabla 18: Valores de longitud de onda máxima en las distintas cápsulas.

Cápsula	Longitud de onda máxima espectro metanol	Longitud de onda máxima espectro metanol- $\text{AlCl}_3$
Ajo	400	420
Matico	320	382

Fuente: elaboración propia

## **DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se implementó una técnica espectroscopia UV-Vis que permite cuantificar e identificar los distintos tipos de flavonoides. Para el análisis se utilizaron dos muestras en forma farmacéutica tipo cápsulas que contienen extractos secos de vegetales, obtenidas en el mercado nacional de Chile. Estas muestras se compararon con 5 patrones de flavonoides de calidad analítica: quercetina, catequina, genisteína, hesperidina y apigenina, los que sirvieron como referencia para lograr implementar la técnica de análisis. La utilización de estos patrones facilitó la identificación de los componentes de interés presentes en cada muestra.

Para poder dilucidar las estructuras, se realizaron análisis de absorción UV-Vis de los productos disueltos en metanol, en primer lugar y agregando a continuación reactivos que permiten la observación de cambios espectroscópicos, en este caso  $AlCl_3$ ; el cual permitió verificar los desplazamientos de las bandas de absorción con respecto de las bandas originales y de esta forma caracterizar los sitios de sustitución en los anillos de la estructura base de los flavonoides.

La implementación de este ensayo colorimétrico también sirvió para cuantificar el contenido de flavona, flavonol, flavanona, isoflavona y flavan -3- ol de los extractos vegetales comerciales. Para lograr este objetivo se realizaron cinco curvas de calibración con los 5 patrones nombrados anteriormente. Las concentraciones utilizadas de los patrones estuvieron entre los 5-50  $\mu g/mL$  lográndose unidades de absorbancias (UA) entre 0,05 y 0,8.

Los extractos secos analizados fueron los contenidos en cápsulas de ajo y cápsulas de matico, ampliamente comercializados en Chile, siendo esta la mayor motivación para investigar los componentes presentes en ellos, dado además el interés actual por evaluar la eficacia y seguridad farmacoterapéutica de los

fitofármacos, así como la calidad de las drogas vegetales que sirven de materia prima para su fabricación.

Para las cápsulas de ajo, se empleó como droga vegetal un extracto de *Allium sativum*, el cual es un bulbo perteneciente a la familia Liliaceae que ha sido ampliamente utilizado con fines curativos desde tiempos antiguos y ha sido evaluado farmacológicamente (24).

En este estudio los resultados del análisis de cápsula de ajo fueron expresados de acuerdo a mg de quercetina equivalentes, dando valores de 12,39 y 7,72 mg equivalentes QE, para la técnica espectrofotométrica con etanol y etanol- $\text{AlCl}_3$ , respectivamente. Con respecto a este resultado se puede decir, que al emplear el solvente etanol es posible evidenciar una mayor cantidad de estructuras tipo flavonoides o similares, en cambio con etanol- $\text{AlCl}_3$  sólo se encontró el complejo formado entre quercetina-Al. Como se ha mencionado anteriormente, los flavonoides forman un complejo estable con  $\text{AlCl}_3$ , de esta manera permiten la cuantificación de flavonoides con estructuras similares y así son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría UV-Vis (63). Los 7,72 mg equivalentes QE corresponderían al valor en mg/g extracto del complejo y se podría expresar como el valor real de quercetina en el fitofármaco. Esta medición se realizó por sextuplicado y hubo un coeficiente de variación menor al 2%, lo que indicaría una buena técnica de análisis.

Como se ha demostrado, efectivamente la cápsula de ajo contiene el flavonoide principal quercetina(24), por ende este fitofármaco cumpliría con la acción farmacoterapéutico indicada. Cabe destacar que esta muestra no presenta en su envase los miligramos equivalentes de flavonoide correspondiente, por lo cual, con este trabajo se evidenció que la cantidad de quercetina que corresponde a una cápsula de 300 mg de ajo es 7,72 mg equivalente QE lo que debiese estar presente en la etiqueta o rotulado.

Por otro lado, en las cápsulas de matico analizadas se emplea un extracto de la especie *Buddleja globosa* Hope. Se ha demostrado que tanto las hojas como las ramas contienen aceites esenciales, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas y flavonoides(26). Dentro de los principales tipos de flavonoides en matico se encuentran las flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas(26). Por lo tanto, en esta muestra se hace más difícil reconocer específicamente el tipo de flavonoide presente, sin llevar a cabo un proceso analítico exhaustivo (por ejemplo HPLC) o un proceso de aislamiento y purificación de estructuras. Esto no forma parte de los objetivos de este trabajo, por otra parte se ha evidenciado en diversos estudios la acción sinérgica que juegan los componentes dentro de un extracto vegetal lo que lleva a su eficiente acción y seguridad farmacoterapéutica.

En la cápsula de matico analizada se expresa en su rotulado que 200 mg equivalen a no menos de 9,0 mg de polifenoles expresados como catequinas.

Por otro lado, los resultados del análisis de cápsula de matico de 200 mg fueron expresados de acuerdo a mg de catequina equivalentes, dando valores de 9,92 y 10,71 mg equivalentes CA, para la técnica espectrofotométrica con etanol y etanol- $\text{AlCl}_3$ , respectivamente. Este resultado evidencia que lo cuantificado en nuestro trabajo, cumple con la cantidad indicada en el rotulado del fitofármaco.

En el análisis con solvente etanol- $\text{AlCl}_3$  donde se puede cuantificar los flavonoides mediante el complejo estable catequina-Al se cuantifica mayor cantidad de flavonoides, obteniéndose un valor de 10,71 mg equivalentes CA.

Esto último se puede explicar ya que como se mencionó anteriormente el extracto de matico posee dentro de su composición más de un tipo de flavonoide, por lo tanto, en el complejo formado y analizado por espectroscopia UV-Vis se pueden haber incorporado en la medición otros quelatos formados con otras estructuras similares de flavonoides, lo cual sería un indicativo de la variada composición de

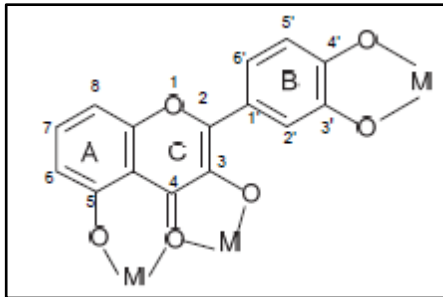
flavonoide que esta planta posee, aumentando así la cantidad cuantificada de la cápsula. De igual manera, cumple lo estipulado en el rotulado, ya que el valor fue mayor a 9 mg de polifenoles de catequina. Esta medición fue realizada por sextuplicado con un valor menor al 2 % de coeficiente de variación.

El Ministerio de Salud y el Reglamento del sistema nacional de control de los productos farmacéuticos de uso humano, en su artículo 40 sobre fitofármacos, explicita que estos deben expresar su fórmula cuali-cuantitativa incluyendo: el tipo de preparación vegetal empleada, tales como extracto seco, extracto fluido, extracto blando, polvo u otro; seguido de la o las partes del vegetal que se emplean, más el nombre científico de la droga vegetal empleada, la concentración y su equivalencia en un marcador vegetal, cuando corresponda(21). Con respecto a esto, la muestra de matico cumple con la información que proporciona el fabricante mientras que la muestra de ajo no cumple con la rotulación adecuada que estipula Chile para su comercialización, ya que no declara la concentración de flavonoide que tiene cada cápsula, ni a qué tipo de flavonoide corresponde.

Con respecto a la segunda parte de este trabajo en la cual se identificaron las estructuras flavónicas en las muestras metanólicas de los distintos estándares, así como de las muestras de las cápsulas, se observó que los espectrogramas presentan dos bandas de absorción máxima bien definidas que permite la identificación de cada estructura, según lo informa la literatura(49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56). Estudiando la forma de los gráficos y la cantidad de máximos y su desplazamiento, se puede decir que los extractos secos de las cápsulas podrían contener algún tipo de flavonoide, según lo indicado por los corrimientos de los estándares analizados. En nuestro caso sólo se empleó como referencia de corrimiento la exposición de cada una de las muestras que contenían flavonoides al  $AlCl_3$ , previendo la formación de quelatos entre las estructuras. La observación de la figura 21 nos permite definir que según la estructura de los diferentes tipos de flavonoides hay tres posibles sitios de coordinación(64):

- a) Entre el grupo 5-hidroxi y 4-carbonilo,
- b) Entre el grupo 3-hidroxi y 4-carbonilo,
- c) Entre el grupo 3', 4'-hidroxi en el anillo B

**Figura 21: Posibles espacios de coordinación en alguna estructura de flavonoides(64)**



**Fuente: Symonowicz M., Kolanek M. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. Biotechnol Food Sci. 2012;76(1):35–41**

A partir de este conocimiento podemos decir que los cinco estándares de referencia utilizados en nuestro trabajo, pueden quelar iones de metales como el aluminio y formar diferentes complejos (Figura 21). Los complejos metal-flavonoides presentan propiedades de barrido mucho más pronunciadas que los flavonoides libres(64).

En el análisis de los estándares se observó un desplazamiento batocrómico en todos los espectrogramas realizado. Estas absorciones experimentan corrimientos en presencia de metales lo que se debe a una insaturación entre los carbonos 2',3',y la posición de los grupos, contribuyen electrónicamente a los sistemas aromáticos (31).

Las bandas I y II se observaron claramente en los 5 estándares flavónicos como se observa en la Figura 17 y se describe a continuación:

- Para Quercetina se observaron ambas bandas tanto la banda I como la banda II, de forma pronunciada.

- En el caso de Catequina la banda II se observó con una intensidad considerable, mientras que la banda I con intensidad leve.
- En el caso de Hesperidina la banda II apareció con intensidad considerable y la banda I se vió moderadamente.
- Para Genisteína fue posible observar la banda II con intensidad moderada y la banda I más intensa.
- Finalmente en Apigenina la banda II se observa más intensa que banda I.

En solución de metanol, todos los flavonoides exhiben una absorción de intensidad entre fuerte y media, en la región de 200-270 nm (Banda II) y a mayor longitud de onda, en la zona de 300-400 nm, aparecen otras bandas de mayor intensidad (Banda I)(28). Lo anterior se puede explicar a partir de la estructura de los flavonoides, ya que si los anillos A y B están oxigenados, la intensidad de la Banda I es mayor que la de la Banda II. La oxigenación de B o A da lugar al desplazamiento batocrómico de las bandas correspondientes.

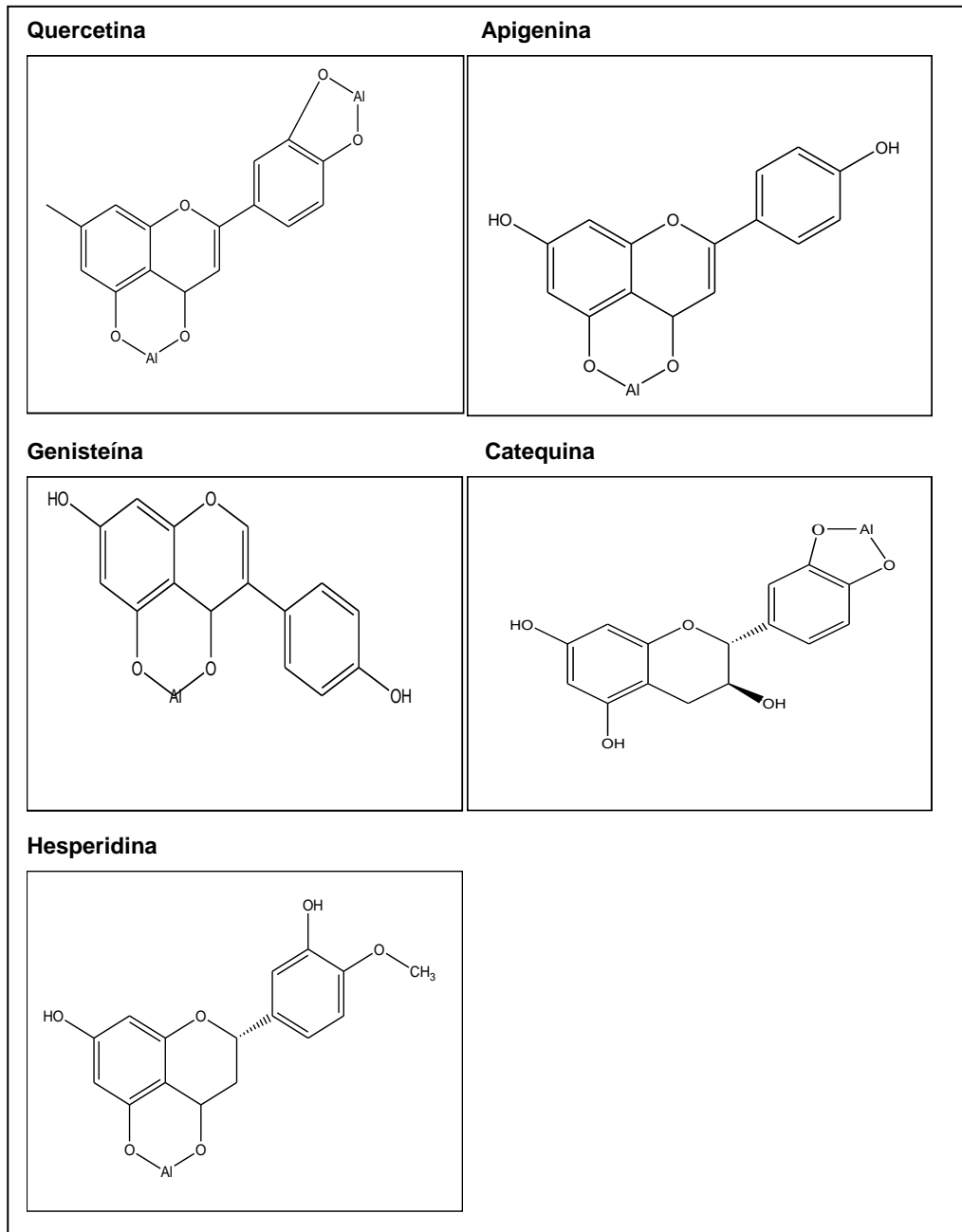
En resumen, luego de realizado este análisis, se proponen las estructuras queladas flavonoide-metal, para los distintos estándares, como aparecen en la figura 22.

Por otra parte, en el análisis de los extractos secos de ajo y matico, se reconocieron las bandas características para quercetina en extracto de ajo (figura 23), y para matico, en catequina, apigenina y quercetina (figura 24).

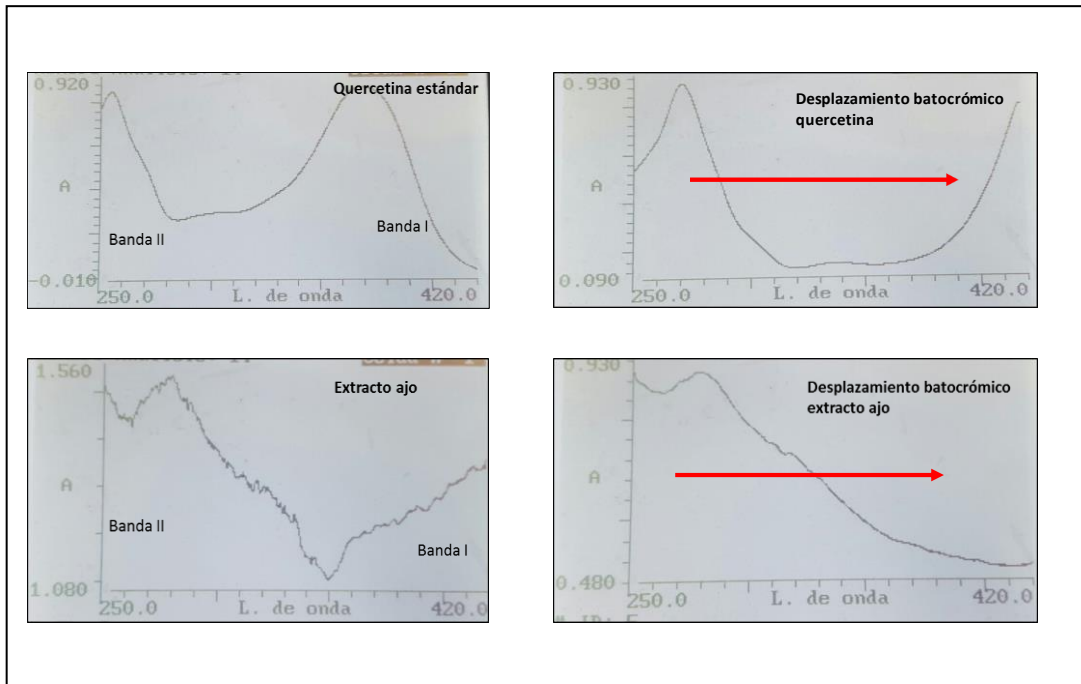
En el extracto seco de ajo, se observó que su longitud de onda máxima es de 400 nm, esta longitud de onda máxima corresponde a quercetina, por lo cual, correspondería al flavonoide encontrado en ajo. En cuanto a matico, su longitud máxima fue 320 nm, la cual se acerca a las relacionadas con catequina, apigenina y quercetina. El extracto de matico posee más de un tipo de flavonoide, por lo tanto, con estos espectrogramas y desplazamientos, sólo se puede

identificar parcialmente el tipo de flavonoide, sin llegar a concluir cuál se encuentra en mayor proporción.

**Figura 22: Posibles posiciones de quelaciones en los estándares de flavonoides estudiados. Quercetina, catequina, hesperidina, genisteína y apigenina.**



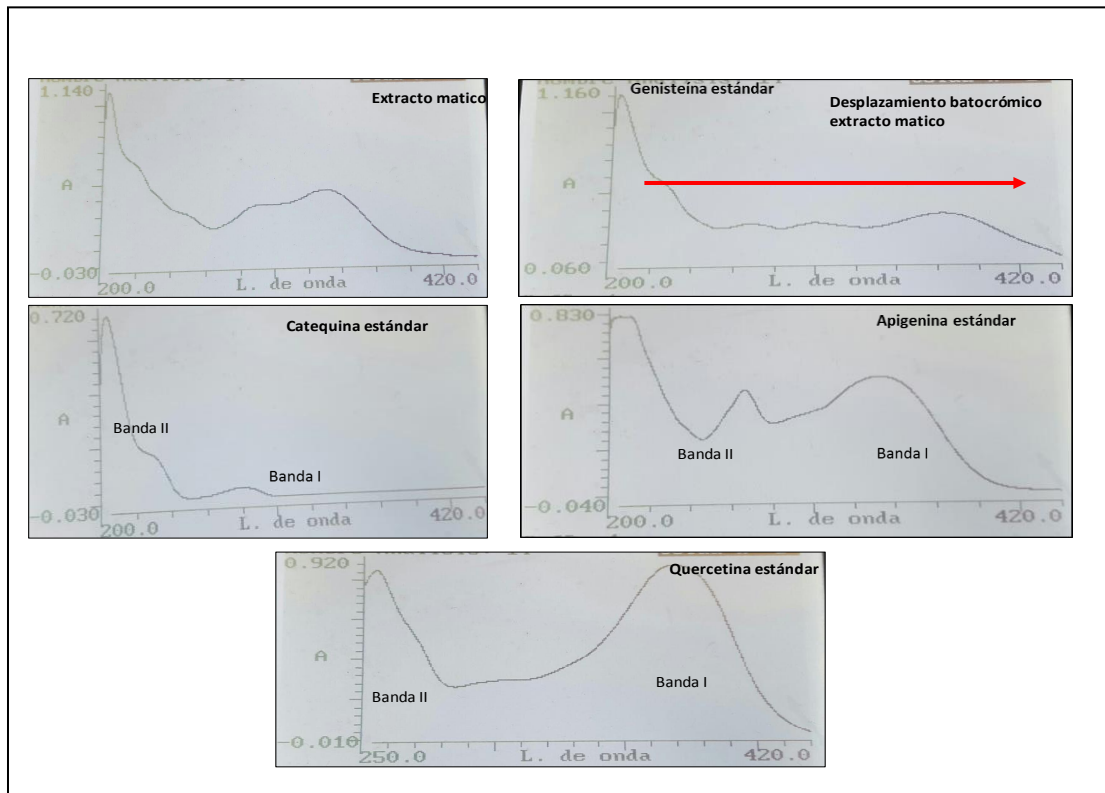
**Figura 23: Espectrograma UV-Vis comparativo de corrimiento de bandas observadas entre quercetina estándar y extracto seco de ajo.**



En cuanto a los desplazamientos observados, en todos los casos, se evidencia un movimiento batocrómico. En relación a esto, se puede analizar que en el extracto de matico, se aprecia un prolongado desplazamiento lo que se debería a las múltiples sustituciones hidroxiladas que posee, posiblemente debido a su diversidad en relación a tipos de flavonoides. En el caso del extracto seco de ajo sólo se evidencia desplazamiento batocrómico concordante con los espectrogramas de quercetina estándar.



Figura 24: Espectrograma comparativo extracto matico con catequina, quercetina, apigenina y hesperidina.



Cabe destacar, que las cápsulas poseen otros componentes en sus formulaciones que participan en la estabilidad y seguridad del fitofármaco, por ejemplo se pueden encontrar carbohidratos como maltodextrinas y fragmentos proteicos como gelatina, los que interfieren en el corrimiento de las bandas. Por lo tanto, en el análisis se pueden presentar residuos estructurales que afectan la absorción causando desplazamientos batocrómicos y cambios en la longitud de onda máxima en las bandas observadas al analizar los dos extractos secos que han sido objeto de estudio en este trabajo.

## **CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

Se implementó la técnica espectroscopia UV-Vis para la identificación y cuantificación de estructuras flavónicas mediante estándares de carácter analítico. Las familias que se lograron identificar y cuantificar fueron, flavononas, flavonol, flavanona, isoflavonas y flavan-3-ols.

Se analizó el corrimiento de las bandas I y II para cada estándar, estas evidenciaron que cada estándar posee bandas intensas, moderadas o leves de absorción en el espectro UV-Vis y son importantes para determinar las sustituciones que posee cada estructura química de la familia flavónica lo que facilita su identificación.

Al aplicar la metodología a dos extractos secos provenientes de fitofármacos comerciales, se logró evidenciar la presencia de flavonoides en ellos. En el extracto de ajo, fue claramente identificado quercetina como principal flavonoide, y en el extracto de matico se evidencia la presencia de más de un flavonoide, mayoritariamente quercetina, catequina y apigenina.

La cantidad de quercetina que corresponde a una cápsula de 300 mg de ajo es 7,72 mg equivalentes QE, lo cual debiese estar rotulado. Para el caso del extracto seco de matico, la cápsula de 200mg contiene 10, 12 mg equivalentes CA, lo cual concuerda estadísticamente con los 9,0 mg expresados como catequina que declara la etiqueta del fitofármaco.

Finalmente, se puede concluir que, la técnica espectrofotométrica implementada, hace posible la identificación tipológica general y la determinación de la concentración de flavonoides presentes en materiales vegetales y extractos de las plantas medicinales que se comercializan en nuestro país y sirven de base para la formulación de fitofármacos.

## **GLOSARIO**

## 8. GLOSARIO

- **Actividad antioxidante:** una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.
- **CA:** catequina
- **Cu<sup>2+</sup>:** cobre divalente.
- **Desplazamiento hipsocrómico:** fenómeno que consiste en el desplazamiento del espectro de absorción, de transmitancia, de reflectancia o de emisión de una molécula hacia una longitud de onda más corta (o una frecuencia más alta).
- **Desplazamientos batocrómico:** fenómeno que consiste en el desplazamiento del espectro de absorción, reflectancia, transmitancia o emisión de una sustancia hacia longitudes de onda de mayores, o lo que es lo mismo, hacia longitudes de onda de menor energía.
- **DMSO:** dimetilsulfóxido.
- **Fe<sup>2+</sup>:** Hierro divalente.
- **Longitud de onda corta:** corresponde una frecuencia alta.
- **Longitud de onda larga:** corresponde a una frecuencia baja.
- **Metrorragias:** Hemorragia uterina fuera del período menstrual.
- **QE:** quercetina
- **Quelatos:** Los quelatos son compuestos formados por un ión metálico y un agente quelatante, este último acompleja (protege) al metal de posibles reacciones químicas.
- **Redox:** reacciones de oxidación-reducción.
- **Venotónicos:** Favorece la circulación sanguínea en el sistema venoso, tonificando la pared de las venas.
- **Vía del ácido Shiquímico:** Vía alternativa para la formación de compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano. Es empleada por microorganismos y plantas, pero no por los animales.
- **Zn<sup>2+</sup>:** zinc divalente.

## **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

## 9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Ávalos García A., Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biol Ser Fisiol Veg.* 2009;2:119–45.
2. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición.* 2002;17:271–8.
3. Aherne S., O'Brien N. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 2002;18:75–81.
4. Yao L.h., Jiang. M. y, Tomás-Barberán f.a. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004;59:113–22.
5. Antioxidantes en alimentos: principales fuentes y sus contenidos | Antioxidantes Portal Antioxidantes Primer Portal de Antioxidantes, Alimentos y Salud en el Mundo de Habla Hispana [Internet]. [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos/>
6. Kumar S., Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J.* 2013;1–16.
7. Pérez G. Los Flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cuba Invest Biomed.* 2003;22:48–57.
8. Cartalla O., Reynaldo I. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultiv Trop.* 2001;22:5–14.
9. Hollman P., Buijsman M., Gamanen Y., Crossen P. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Vol. 31.* 1999. 569–573 p.
10. Andersen M., Markham K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. CRC Press Taylor Francis Group. 2006;
11. Quiñones M, Miguel M, Alexandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012;27:77–8.
12. Silva L, Pezzini B, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(41):96.
13. Saskia ABE, Accker V., Bast A. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. Ed Marcel Dekker. 1999;9:224.

14. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev.* julio de 2003;23(4):519–34.
15. Kaur H, Bimlesh K, Prasher S, Salhan M. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Sci.* 2011;1:4.
16. Tapas A., Sakarkar D., Kakde R. Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res.* 2008;7:189–99.
17. Luengo L, Tránsito M. Flavonoides. *Offarm.* :108–13.
18. Agrawal A. Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *Int J Pharm Sci Nanotechnol.* 2011;4:1394–8.
19. Martínez C. Identificación de flavonoides con actividad antioxidante presentes en *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae). [Colombia]: Universidad Tecnológica De Pereira; 2014.
20. Lopes de Azambuja CR, dos Santos LG, Rodrigues MR, Rodrigues RFM, da Silveira EF, Azambuja JH, et al. Physico-chemical characterization of asolectin–genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. *Chem Phys Lipids.* 1 de diciembre de 2015;193:24–35.
21. ds\_minsal\_3\_2010.pdf [Internet]. [citado 22 de mayo de 2018]. Disponible en:  
[http://www.ispch.cl/ley20285/t\\_activa/marco\\_normativo/7c/ds\\_minsal\\_3\\_2010.pdf](http://www.ispch.cl/ley20285/t_activa/marco_normativo/7c/ds_minsal_3_2010.pdf)
22. Muhammad G, Muammad I, Sobia K, Dawood A, Muhammad JA, Kashis SA, et al. A comparative study of antimicrobial and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) extracts in various localities of Pakistan. *Afr J Plant Sci.* 30 de junio de 2014;8(6):298–306.
23. Gómez LJG, Sánchez-Muniz FJ. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). :23.
24. Ramírez-Concepción HR, Castro-Velasco LN, Martínez-Santiago E. Efectos Terapéuticos del Ajo. 2016;9.
25. Ministerio de Salud. Medicamentos herbarios tradicionales, 103 especies vegetales. Gobierno de Chile; 111–112 p.
26. Arroyo J, Hañari R, Tinco A, Baca D, Domínguez L, Buendía J. Efecto antihipertensivo del extracto de matico sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. *An Fac Med.* octubre de 2012;73(4):275–80.



27. Rosenberg R, Jenkins D, Diamandis E. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J Chromatogr.* 2002;219–32.
28. Pisoschi A., Petre G. Methods to determine the total antioxidant activity. *OMICS Int.* 2011;1:1–12.
29. Oliveira J., Gómez J., Mitie A., Baffa O. Correlation between antioxidant activity and coffee beverage quality by electron spin resonance spectroscopic. *Cienc E Agrotecnología.* 2013;1–6.
30. Pinheiro P, Justino G. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications. *Phytochem – Glob Perspect Their Role Nutr Health.* 2014;1:1–10.
31. Base estructural para absorbancia de luz de flavonoides. | Open-i [Internet]. [citado 9 de marzo de 2018]. Disponible en: [https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2852856\\_ijms-11-00595f10&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2852856_ijms-11-00595f10&req=4)
32. Martínez A. Flavonoides. *Univ Antioquina.* 2005;
33. Mayur P., Priya V., Gayathri R. Quercetin – A Flavonoid :A Systematic Review. *J Pharm Sci Res.* 2016;8:878–80.
34. Álvarez Castro E, Orallo Cambeiro F. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm.* :130–40.
35. Vicente L., Prieto M., Morales A. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Rev Toxicol Esp.* 2013;30:171–81.
36. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* abril de 1996;2(4):659–68.
37. Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *Int J Food Prop.* 3 de junio de 2017;20(6):1197–238.
38. Zhou X, Wang F, Zhou R, Song X, Xie M. Apigenin: A current review on its beneficial biological activities: Zhou et al. *J Food Biochem.* agosto de 2017;41(4):e12376.
39. Mauludin r, Müller rh. Physicochemical properties of hesperidin nanocrystal. 5:7.
40. Cao R, Yang X, Strappe P, Blanchard C, Zhou Z. Natural products derived from tea on the solubility of hesperidin by LC-TOF/MS and NMR. *Int J Food Prop.* 18 de diciembre de 2017;20(sup1):S270–8.

41. Danciu C, Soica C, Oltean M, Avram S, Borcan F, Csanyi E, et al. Genistein in 1:1 Inclusion Complexes with Ramified Cyclodextrins: Theoretical, Physicochemical and Biological Evaluation. *Int J Mol Sci*. 27 de enero de 2014;15(2):1962–82.
42. Preedy VR. *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. Royal Society of Chemistry; 2012. 711 p.
43. RENUT 2007 TEC\_1\_7-10.pdf [Internet]. [citado 29 de marzo de 2018]. Disponible en: [http://www.iidenut.org/pdf\\_revista\\_tec\\_libre/Renut%201/RENUT%202007%20TEC\\_1\\_7-10.pdf](http://www.iidenut.org/pdf_revista_tec_libre/Renut%201/RENUT%202007%20TEC_1_7-10.pdf)
44. fact-pro-catechins.pdf [Internet]. [citado 29 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://nutrition.ucdavis.edu/content/infosheets/factsheets/fact-pro-catechins.pdf>
45. Thermo Scientific. Manual espectrofotómetro Thermo Scientific Orion AquaMate Aquamate 8000 Uv-vis. Vol. 1. 2015. 1–10 p.
46. Alvarez S. Organoleptic characterization and physical-chemistry of propolis of the department of la liberta, Perú. *Biol Lima*. 2012;1(10):1–7.
47. Khatiwora E., Adsul V., Torane R., Gaikwad S., Deshpande n. spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of citrus limon peel from north eastern region of india. *j Drug Deliv Ther*. 2017;1:21–4.
48. Herrera M. Cuantificación de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica y evaluación de la actividad antioxidante en extractos de frutos y hojas de *Pouteria Splendens* (a.dc.) Kuntze. [Laboratorio de Investigación Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello]; 2017.
49. Amaya L., Portillo C. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. [Facultad de química y farmacia]: Universidad del Salvador; 2013.
50. Ibrahim Y., Musa A., Yakasai L. Spectrophotometric method for determination of catechins in green tea and herbal formulations. *Niger J Pharm Sci*. 2017;16(1):25–30.
51. Mitra S. UV-Vis spectrophotometry plus HPLC to measure the level of catechin/poly-phenolics and to understand its oxidized conditions in commercially available green and black teas. *Indian J Chem*. 2014;53B:1255–62.

52. Atomssa T., Gholap V. Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer. *J Eng Technol Res.* 2015;7:22–31.
53. Costa César I., Castro B., Duarte C., Aguiar E., Pianetti G., Moreira L. Quantitation of genistein and genistin in soy dry extracts by UV-Visible spectrophotometric method. *Quim Nova.* 2008;31(8):1933–6.
54. Srilatha D, Nasare M, Nagasandhya B, Prasad V, Diwan P. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Hesperidin and Diosmin in the Pharmaceutical Dosage Form. *ISRN Spectrosc.* 2013;2013:1–4.
55. Meneses-Reyes JC, Soto-Hernández RM, Espinosa-Solares T, Ramírez-Guzmán ME. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia.* junio de 2008;42(4):425–33.
56. Asep N., Taofik R., Anas S. Validation of UV-Vis spectrophotometry method for analysis of apigenin in celery extract (*Apium graveolens* L.). *Pharmaciana.* 2017;7:159–68.
57. resolución\_exenta\_201\_2015.pdf [Internet]. [citado 17 de abril de 2018]. Disponible en: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resoluci%C3%B3n\\_exenta\\_201\\_2015.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resoluci%C3%B3n_exenta_201_2015.pdf)
58. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods.* octubre de 2014;7(9):1776–82.
59. Dantas A., Rhayanny M., Perelli K., Pereira T., Lira L. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *Sci World J.* 2012;1–7.
60. JAin sa, Patel ad, Prajapati Nk, Prajapati sp. Extraction of flavonoids of seed coat of *bauhinia tomentosa*. 2011;7.
61. Pedrasa I. Estudio fitoquímico, microbiológico y farmacológico de *lophopappus tarapacanus* (phil.) cabr. asteraceae. especie vegetal de la región altoandina.”. [facultad de ciencias químicas y farmacéuticas departamento de química farmacológica y toxicológica laboratorio de productos naturales]: Universidad de Chile; 2004.
62. Marcos MAD, Marzo V. Introducción a la metrología química curvas de calibración en los métodos analíticos. :9.

63. Salamanca G., Correa I., Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootec Trop.* 2007;25(2):95–102.
64. Symonowicz M., Kolanek M. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnol Food Sci.* 2012;76(1):35–41.

**ANEXOS**

**Anexo 1: Tabla curva de calibrado quercetina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración quercetina (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,027	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
10	0,041	0,041	0,041	0,043	0,041	0,041
25	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085
50	0,181	0,18	0,18	0,18	0,18	0,181

**ABS : Absorbancia**

Concentración quercetina (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coficiente variación
5	0,028	0,0004	1,466
10	0,041	0,0008	1,975
25	0,085	0,0000	0,000
50	0,180	0,0005	0,286

**Anexo 2: Tabla curva de calibrado quercetina-etanol-AlCl<sub>3</sub> por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración quercetina -AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,068	0,070	0,068	0,067	0,068	0,068
10	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,140
25	0,416	0,416	0,416	0,415	0,416	0,414
50	0,919	0,919	0,920	0,919	0,919	0,918

**ABS : Absorbancia**

Concentración quercetina -AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coficiente variación
5	0,068	0,0009	1,442
10	0,140	0,0005	0,367
25	0,416	0,0008	0,201
50	0,919	0,0006	0,068

**Anexo 3: Tabla curva de calibrado catequina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración Catequina ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,059	0,059	0,058	0,058	0,059	0,059
10	0,121	0,122	0,118	0,122	0,122	0,122
25	0,259	0,259	0,259	0,259	0,258	0,256
50	0,505	0,505	0,504	0,505	0,505	0,506

**ABS : Absorbancia**

Concentración Catequina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente variación
5	0,059	0,0005	0,880
10	0,121	0,0016	1,322
25	0,258	0,0015	0,468
50	0,505	0,0006	0,125



**Anexo 4: Tabla curva de calibrado catequina-etanol-AlCl<sub>3</sub> por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración catequina -AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,088	0,088	0,088	0,086	0,085	0,085
10	0,179	0,179	0,178	0,175	0,173	0,172
25	0,32	0,321	0,321	0,319	0,317	0,31
50	0,591	0,59	0,589	0,588	0,575	0,57

**ABS : Absorbancia**

Concentración catequina -AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coficiente variación
5	0,086	0,0015	1,737
10	0,176	0,003	1,760
25	0,318	0,004	1,319
50	0,584	0,008	1,537

**Anexo 5: Tabla curva de calibrado hesperidina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración hesperidina (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,068	0,068	0,068	0,068	0,067	0,069
10	0,125	0,125	0,124	0,124	0,123	0,126
25	0,304	0,305	0,305	0,304	0,305	0,305
50	0,627	0,62	0,628	0,628	0,628	0,63

**ABS : Absorbancia**

Concentración hesperidina (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coficiente Variación
5	0,068	0,0006	0,930
10	0,125	0,001	0,842
25	0,305	0,0005	0,169
50	0,627	0,003	0,556

**Anexo 6: Tabla curva de calibrado hesperidina-etanol-AlCl<sub>3</sub> por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración hesperidina-AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,110	0,111	0,110	0,110	0,110	0,110
10	0,231	0,231	0,231	0,231	0,23	0,231
25	0,500	0,503	0,500	0,500	0,500	0,500
50	0,890	0,891	0,891	0,891	0,890	0,890

**ABS : Absorbancia**

Concentración hesperidina-AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente variación
5	0,110	0,0004	0,370
10	0,231	0,0004	0,176
25	0,500	0,001	0,244
50	0,890	0,0005	0,061

**Anexo 7: Tabla curva de calibrado genisteína-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración genisteína (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
10	0,029	0,030	0,028	0,029	0,029	0,029
25	0,100	0,099	0,099	0,100	0,101	0,100
50	0,202	0,197	0,197	0,195	0,195	0,195

**ABS : Absorbancia**

Concentración genisteína (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coficiente variación
5	0,014	0,000	0,000
10	0,029	0,0006	2,180
25	0,099	0,0007	0,754
50	0,197	0,003	1,378

**Anexo 8: Tabla curva de calibrado genisteína-etanol-AlCl<sub>3</sub> por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración genisteína-AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,065	0,065	0,065	0,065	0,064	0,064
10	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106
25	0,231	0,231	0,229	0,228	0,233	0,231
50	0,424	0,424	0,424	0,425	0,424	0,424

**ABS : Absorbancia**

Concentración genisteína-AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coficiente de variación
5	0,064	0,0005	0,798
10	0,106	0,000	0,000
25	0,230	0,002	0,763
50	0,424	0,0004	0,096

**Anexo 9: Tabla curva de calibrado apigenina-etanol por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración apigenina (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,114	0,114	0,114	0,114	0,113	0,113
10	0,230	0,229	0,229	0,228	0,227	0,227
25	0,501	0,501	0,500	0,499	0,500	0,500
50	0,890	0,89	0,898	0,898	0,898	0,897

**ABS : Absorbancia**

Concentración apigenina (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente variación
5	0,113	0,0005	0,002
10	0,228	0,001	0,002
25	0,500	0,0007	0,0006
50	0,895	0,004	0,002

**Anexo 10: Tabla curva de calibrado apigenina-etanol-AlCl<sub>3</sub> por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Concentración apigenina-AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS 5	ABS 6
5	0,270	0,269	0,269	0,270	0,270	0,270
10	0,352	0,351	0,351	0,350	0,350	0,350
25	0,599	0,600	0,600	0,599	0,598	0,597
50	0,956	0,958	0,956	0,955	0,954	0,954

**ABS : Absorbancia**

Concentración apigenina-AlCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente variación
5	0,270	0,0005	0,0008
10	0,351	0,0008	0,001
25	0,599	0,001	0,0008
50	0,956	0,001	0,0007

**Anexo 11: Tabla absorbancias muestra cápsula de ajo-etanol y muestra cápsula ajo-etanol-AlCl<sub>3</sub>, Natura Laboratorios, por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Muestra	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS5	ABS6
Ajo -etanol	0,138	0,14	0,138	0,139	0,138	0,138
Ajo- etanol-AlCl <sub>3</sub>	0,42	0,419	0,418	0,418	0,418	0,417

**ABS : Absorbancia**

Muestra	Promedio absorbancia	Desviación estándar	coeficiente variación
Ajo -etanol	0,139	0,0008	0,604
Ajo - etanol-AlCl <sub>3</sub>	0,418	0,001	0,246



**Anexo 12: Tabla absorbancias de extracto seco expresado en mg de quercetina (QUE).**

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>µg/mL</b>	<b>mg QUE/g extracto seco</b>	<b>mg QUE/100g extracto seco</b>
Ajo-Etanol	0,139	38,765	12,385	1238,517
Ajo-Etanol AlCl <sub>3</sub>	0,418	24,162	7,719	771,958

**Anexo 13: Tabla absorbancias muestra cápsula Matico-etanol y muestra cápsula Matico-etanol-AlCl<sub>3</sub>, por sextuplicado e indicadores estadísticos.**

Muestra	ABS1	ABS2	ABS3	ABS4	ABS5	ABS6
Matico-etanol	0,251	0,251	0,249	0,250	0,249	0,250
Matico-etanol AlCl <sub>3</sub>	0,28	0,281	0,279	0,278	0,277	0,279

**ABS : Absorbancia**

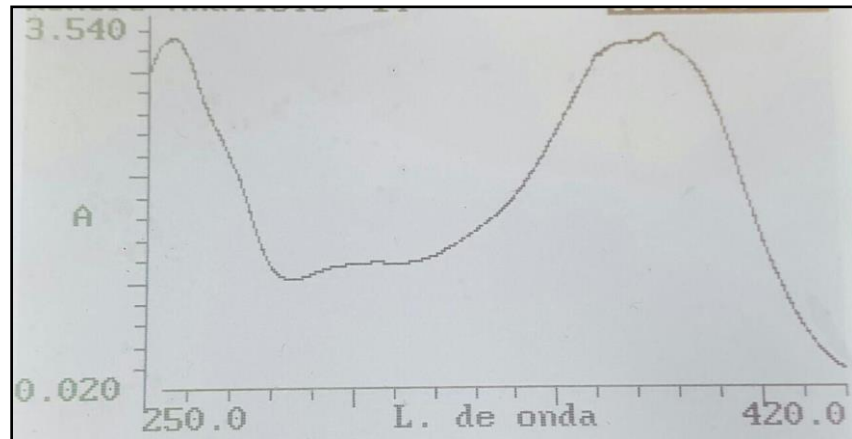
Muestra	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente Variación
Matico-etanol	0,250	0,0008	0,357
Matico-etanol AlCl <sub>3</sub>	0,279	0,001	0,506

**Anexo 14: Tabla absorbancias de extracto seco matico expresado en mg de catequina (CA).**

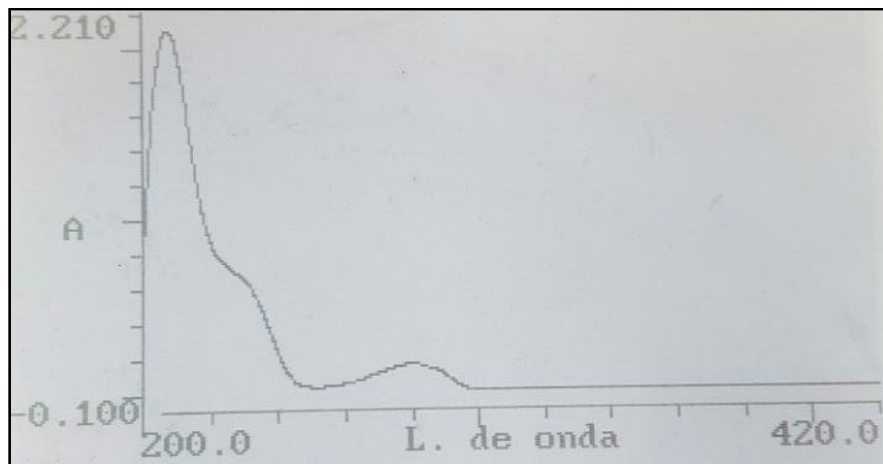
<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>µg/mL</b>	<b>mg CA/g extracto seco</b>	<b>mg CA/100g extracto seco</b>
Matico-Etanol	0,250	19,843	9,921	992,187
Matico-Etanol AlCl <sub>3</sub>	0,279	21,4112	10,705	1070,560

Anexo 15: Peak máximo de estándares y muestras de flavonoides en concentración inicial de 0,001 mg/mL para estándares. (a) quercetina, (b) catequina, (c) hesperidina, (d) genisteína y (e) apigenina.

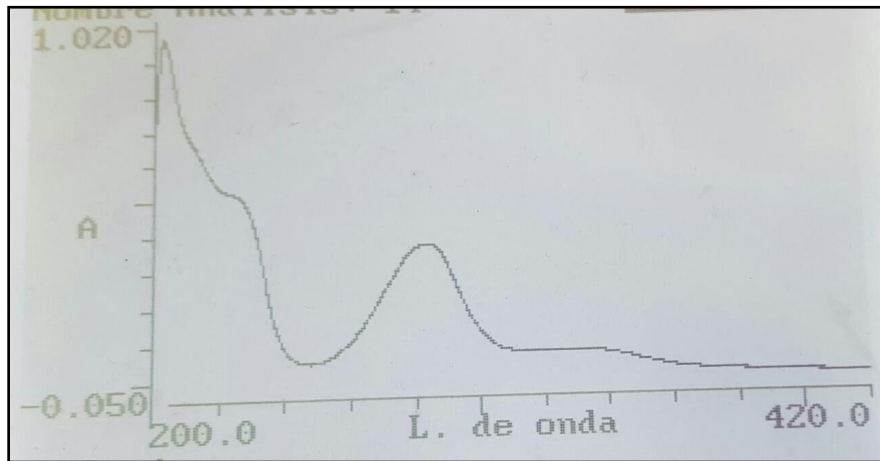
(a)



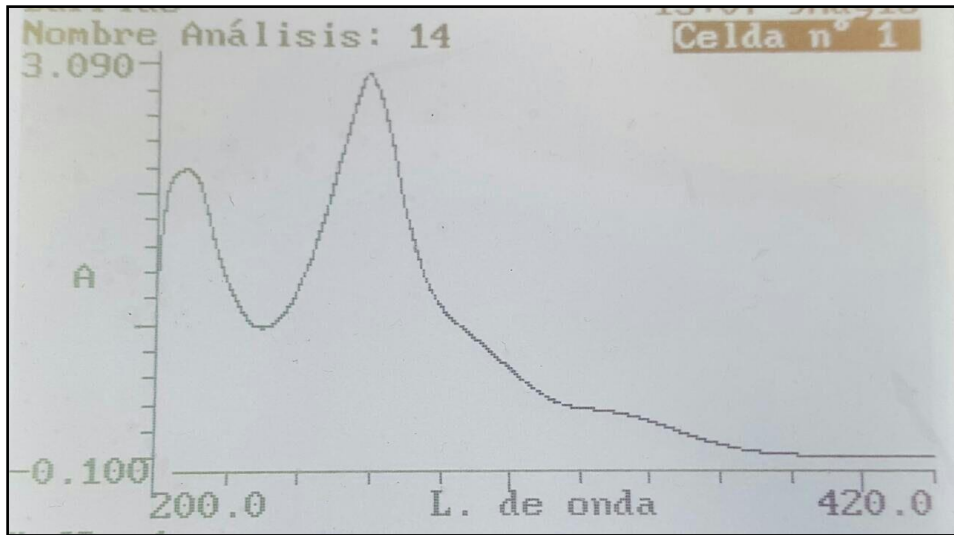
(b)



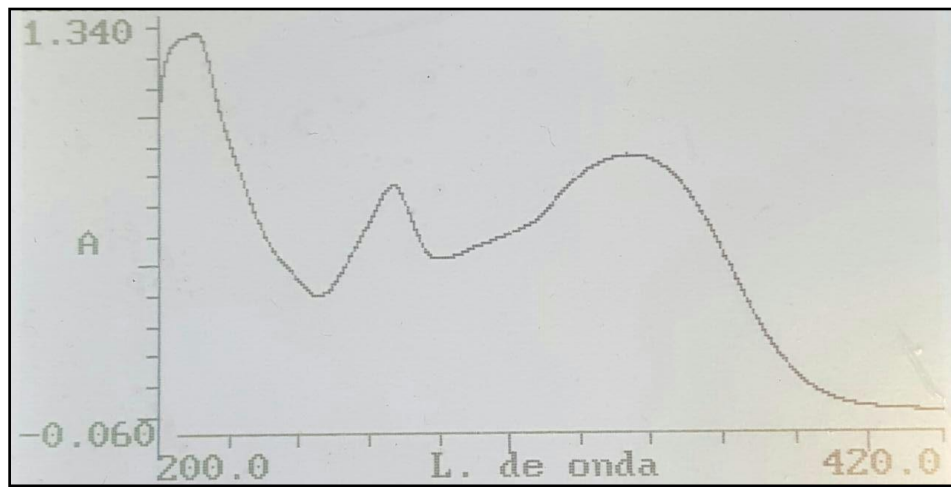
(c)



(d)

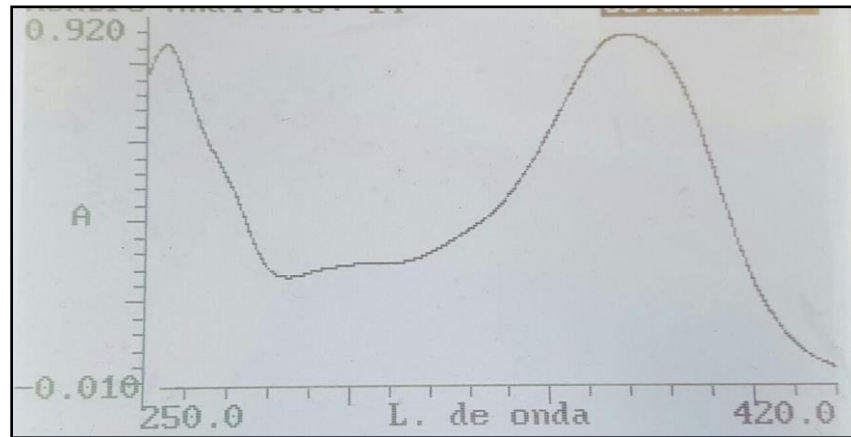


(e)

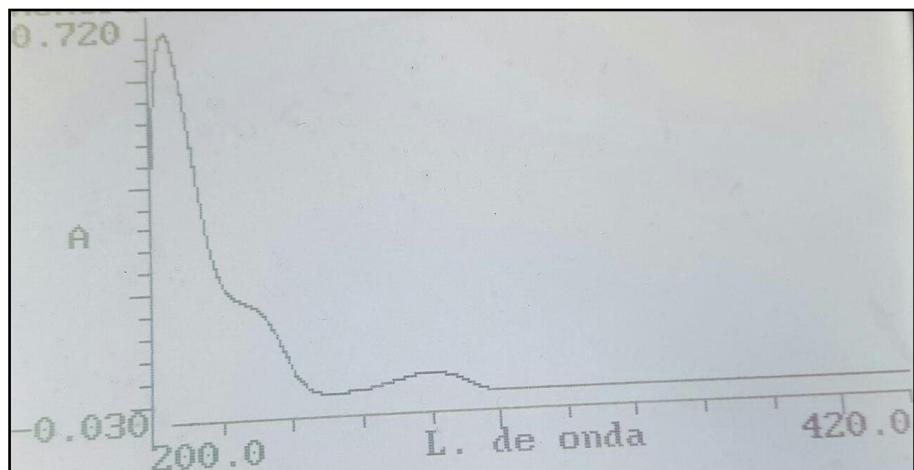


Anexo 16: Ajuste de concentración en espectro metanólico para la determinación de peak de cada estándar de flavonoide entre 0,6 y 0,9 ABS. (a) quercetina, (b) catequina, (c) hesperidina, (d) genisteína y (e) apigenina.

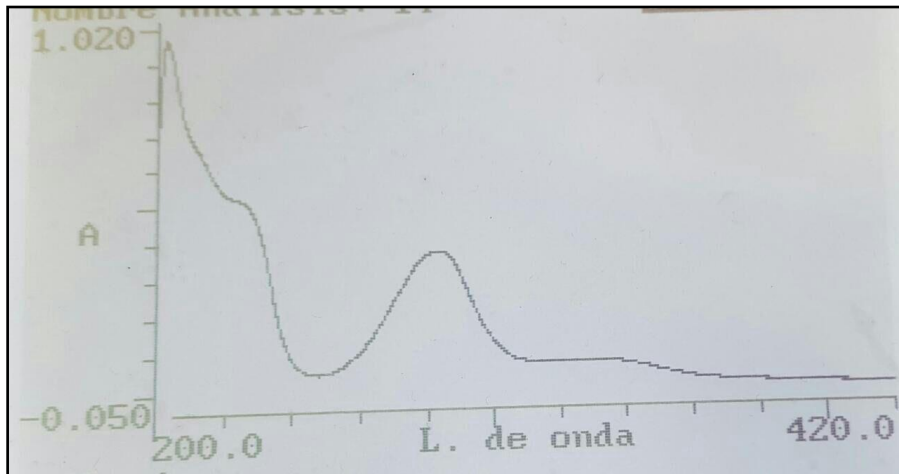
(a)



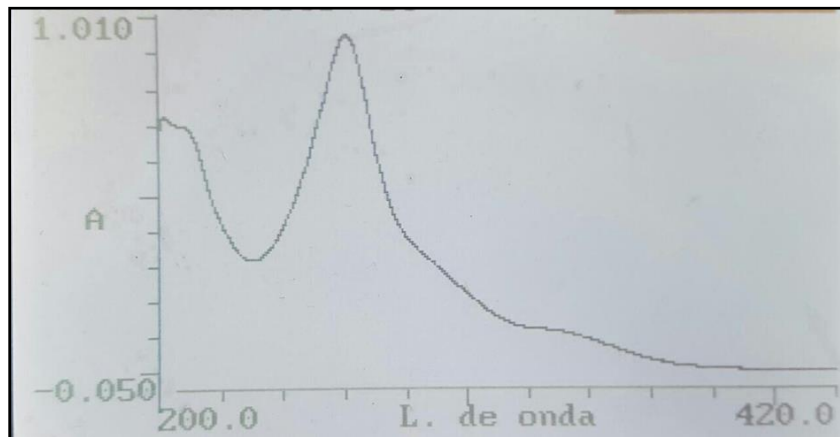
(b)



(c)

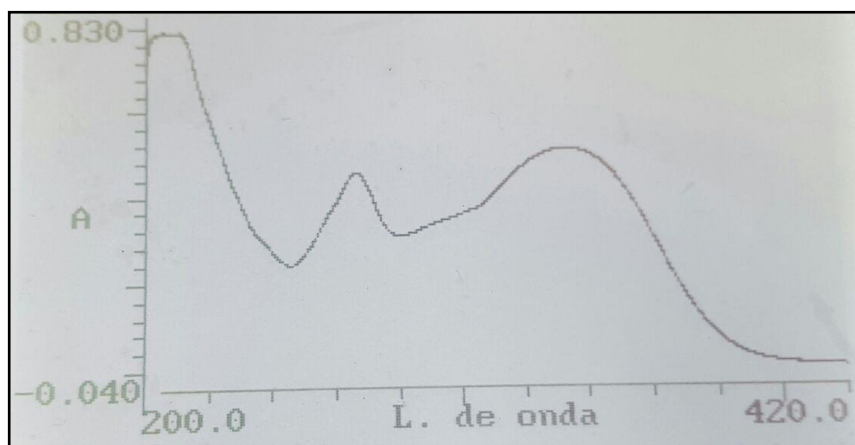


(d)



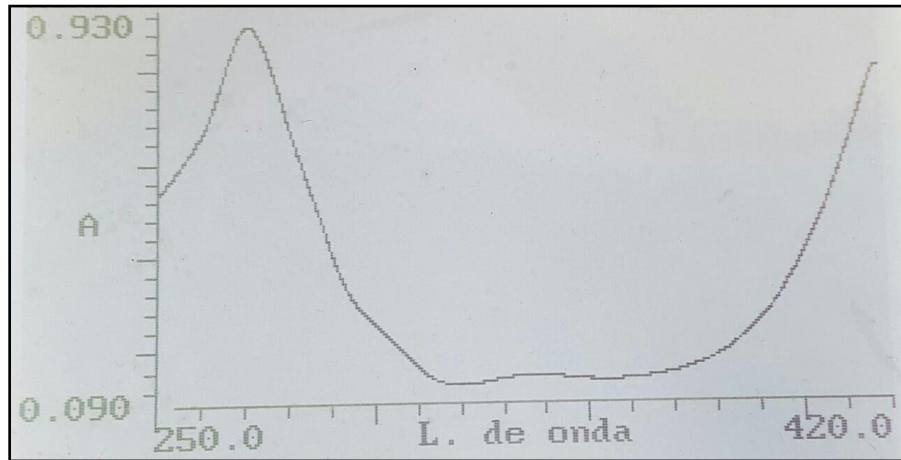


(e)

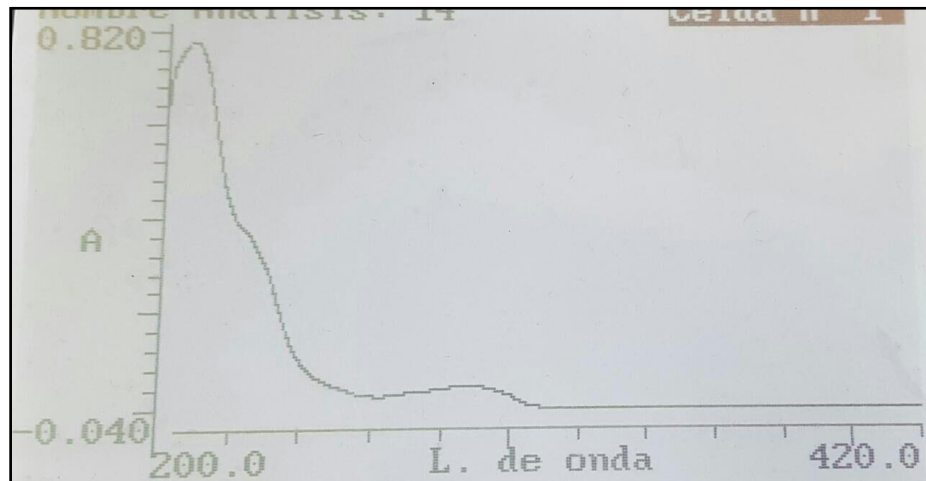


Anexo 17: Ajuste de concentración en espectro metanólico- $\text{AlCl}_3$  para la determinación de peak de cada estándar de flavonoide entre 0,6 y 0,9 ABS. (a) quercetina, (b) catequina, (c) hesperidina, (d) genisteina y (e) apigenina.

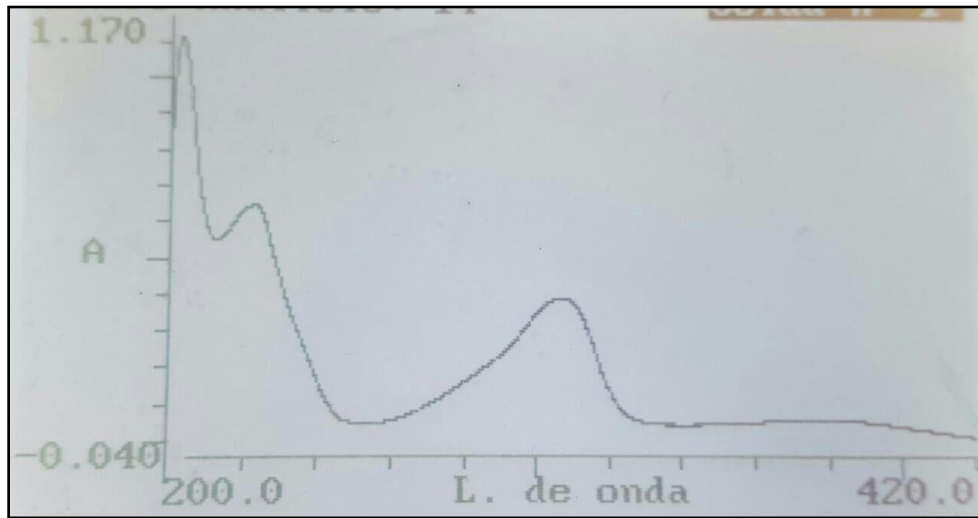
(a)



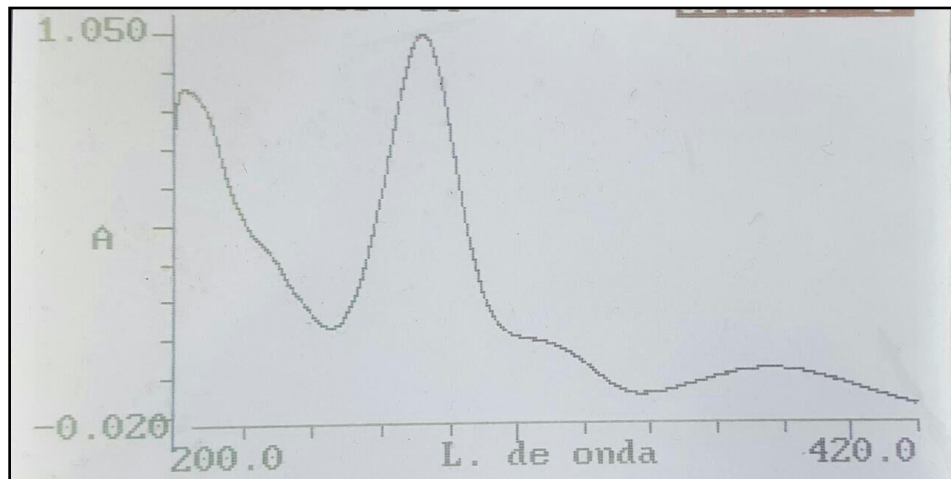
(b)



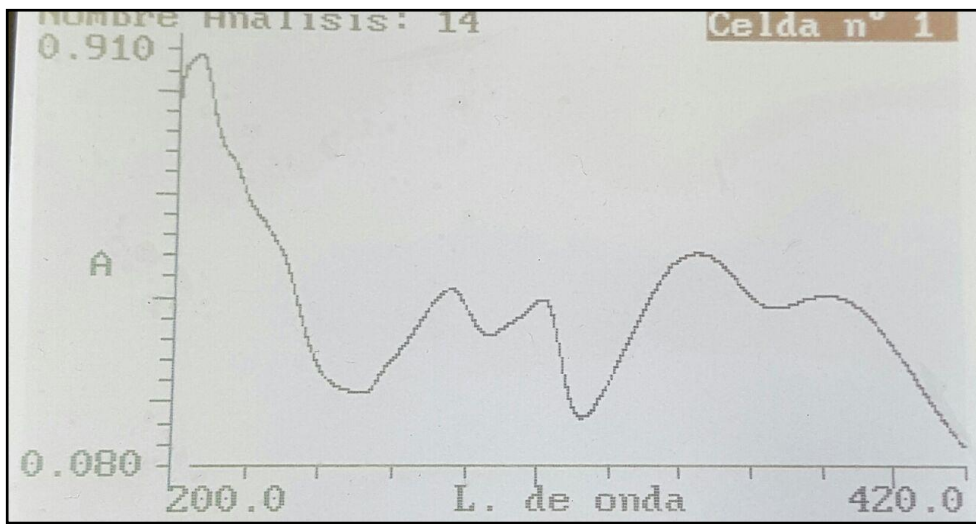
(c)



(d)

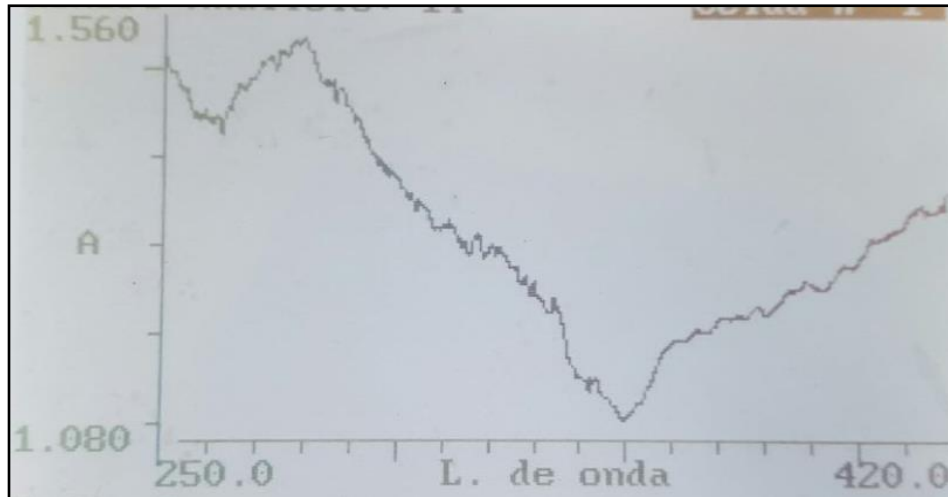


(e)

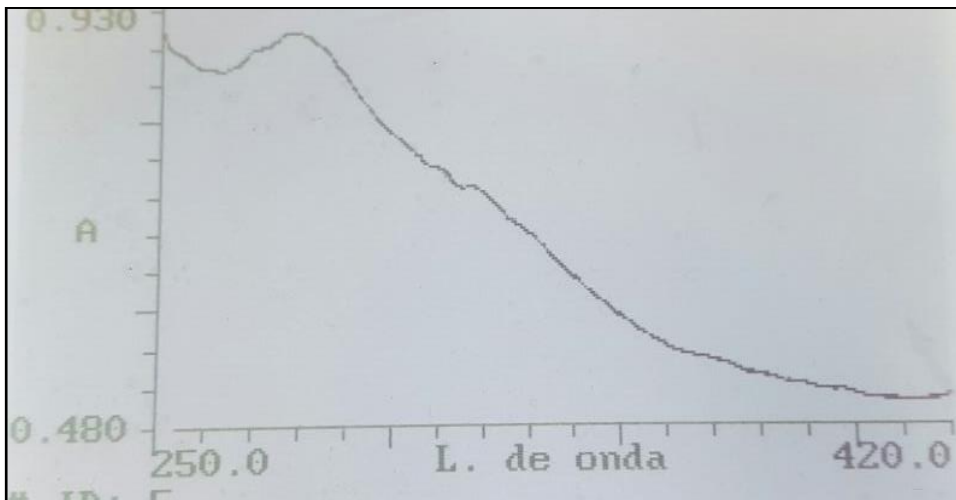


Anexo 18: soluciones de muestra de estudio en espectro metanólico y metanólico- $\text{AlCl}_3$  para la determinación de peak de cada muestra. (a) Cápsula de ajo- metanol, (a.1) Cápsula de ajo- metanol- $\text{AlCl}_3$ , (b) Cápsula de matico-metanol, (b.1) Cápsula de matico-metanol- $\text{AlCl}_3$ .

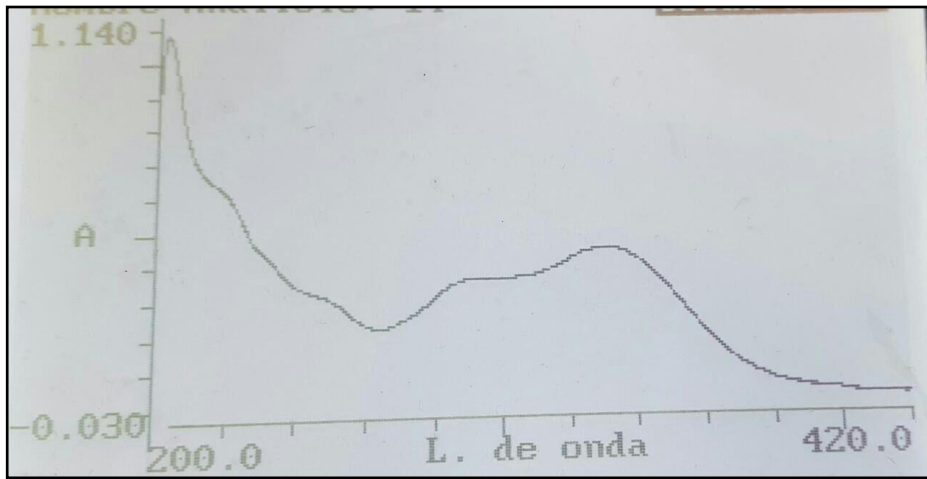
(a)



(a.1)



(b)



(b.1)

