

Elucidación estructural y actividad antioxidante de metabolitos del extracto de hojas de *Tristerix chodatianus*

Structural elucidation and antioxidant activity of secondary metabolites of the extract of leaves of *Tristerix chodatianus*

Junior Medrano Alvites¹ <https://orcid.org/0000-0001-9819-8841>

Eneydo Huamani García¹ <https://orcid.org/0000-0001-7854-9755>

Santos Haydee Chávez Orellana¹ <https://orcid.org/0000-0002-8717-4307>

Manuel Alfredo Valle Campos¹ <https://orcid.org/0000-0002-0187-5744>

Eddy Loyola Gonzales¹ <https://orcid.org/0000-0002-9491-0456>

Felipe Artemio Surco Laos^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-0805-5535>

¹Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ciudad Universitaria, Ica, Perú.

*Autor para la correspondencia: Felipe.surco@unica.edu.pe

RESUMEN

Introducción: La especie *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) "pupa" posee actividad antioxidante y antimicrobiana y su extracto en acetato de etilo es el más activo, al contener compuestos fenólicos como flavonoides y taninos.

Objetivo: Determinar la estructura y actividad antioxidante de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) "pupa".

Métodos: La obtención del extracto se realizó por el método de reflujo, uso de solventes de polaridad creciente y aislamiento de metabolitos secundarios por fraccionamiento rápido al vacío y sucesivas columnas cromatográficas, para lo

que se utilizó Sephadex LH-20 y gel de sílice G-60. Las fracciones obtenidas se agruparon mediante cromatografía en capa delgada y los productos finales purificados por cromatografía de capa fina preparativa. La elucidación estructural de los metabolitos secundarios se basó en los datos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas ultravioletas de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C)

Resultados: Se obtuvieron como productos mayoritarios los flavonoides, rutina, quercetina y quercitrina. La actividad antioxidante por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo indicó que el flavonoide quercetina resultó ser el más activo de los metabolitos presentes.

Conclusión: Los compuestos en mayoría responsable de la actividad antioxidante del extracto de hojas de *Tristerix chodatianus* son de naturaleza flavonoide.

Palabras clave: *Tristerix chodatianus*; elucidación estructural flavonoides; método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

ABSTRACT

Introduction: The species *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) "pupa" possesses antioxidant and antimicrobial activity and its ethyl acetate extract is the most active, containing phenolic compounds such as flavonoids and tannins.

Objective: To determine the structure and antioxidant activity of secondary metabolites obtained from the ethyl acetate extract of *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) "pupa" leaves.

Methods: The extract was obtained by the reflux method, using solvents of increasing polarity and isolation of secondary metabolites by rapid fractionation under vacuum and successive chromatographic columns, using Sephadex LH-20 and silica gel G-60. The fractions obtained were pooled by thin layer chromatography and the final products purified by preparative thin layer chromatography. Structural elucidation of the secondary metabolites was based on data obtained by ultraviolet proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and carbon 13 nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR) spectroscopic techniques.

Results: Flavonoids, rutin, quercetin and quercitrin were obtained as major products. Antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical method indicated that the flavonoid quercetin was the most active of the metabolites present.

Conclusion: The compounds mostly responsible for the antioxidant activity of *Tristerix chodatianus* leaf extract are flavonoid in nature.

Keywords: *Tristerix chodatianus*; structural elucidation; flavonoids; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical method.

Recibido:10/04/2023

Aceptado: 29/08/2024

Introducción

La medicina tradicional gana cada vez más la atención de los sistemas de salud y en el Perú es una ciencia empírica que se remota a sus ancestros los incas, quienes dejaron como legado su conocimiento. Se debe continuar investigando dada la mega diversidad de especies presentes en el país.⁽¹⁾

El género *Tristerix* está compuesto por once especies distribuidas en la cordillera de los Andes de Colombia a Chile y presenta su mayor diversidad en el Perú, donde se encuentran siete de sus 11 especies, cuatro de ellas endémicas.⁽²⁾ Son plantas parasitarias porque dependen de un huésped para obtener los nutrientes que necesitan.

En la medicina popular peruana se utiliza por sus diversas propiedades medicinales, como hipotensor, *Tristerix verticillatus*,⁽²⁾ astringente, *Tristerix corymbosus*,⁽³⁾ antiinflamatorio y antimicrobiano, *Tristerix longibracteatus* (Desr.) Barlow & Wien.⁽⁴⁾

En el año 2009 se inició el estudio de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) comúnmente llamada pupa,⁽⁵⁾ especie de los bosques alto andinos

que habita desde Colombia hasta Chile, lugares donde es hemiparasitaria e induce daño solo al género *Polylepis* (Rosaceae) y que en el Perú^(6,7) se usa en la medicina tradicional en forma de infusión para aliviar enfermedades del sistema genitourinario entre la población de la región de Ayacucho-Perú.

Esta planta ha sido objeto de investigaciones⁽⁵⁾ previas cuyos resultados han proporcionado información acerca de sus grupos de metabolitos secundarios, determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de su extracto total. Entre sus resultados dieron a conocer que, entre sus extractos, el que posee mayor actividad es el extracto de acetato de etilo. De este extracto se conoce que muchos de los compuestos de tipo fenólico y en especial de flavonoides son un grupo de fitoquímicos que se encuentran entre los antioxidantes más potentes y abundantes en la dieta asociados a esta propiedad,^(8,9) a pesar de que su identificación sea un trabajo complejo debido a sus variaciones estructurales y posicionamiento en los grupos funcionales.⁽¹⁰⁾

Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo determinar la estructura y actividad antioxidante de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) "pupa".

Métodos

Todos los reactivos y solventes usados resultaron de grado analíticos (Merck. Alemania) y los patrones de quercetina, quercitrina y rutina de Sigma Aldrich (USA).

Recolección y secado de la planta:

La recolección del material vegetal que crece en las cuestas rocosas de los Andes peruanos se realizó en el mes de febrero del año 2018 en el pueblo de Tambo Quemado, distrito de Leoncio Prado, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho, latitud 14° 43' 42.8" S; longitud 74° 40' 12.8" W, altitud 2700 ms.n.m.

Las hojas de *Tristerix chodatianus* se secaron a temperatura ambiente en ausencia directa de rayos solares por un período de 21 días, momento en que se seleccionaron sus hojas en buen estado, las que se molieron en un molino de analítico (Ika, USA), para luego ser guardadas en botellas de vidrio ámbar de boca ancha hasta el momento del análisis.

Clasificación taxonómica, la especie se clasificó en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; según el sistema de clasificación de Cronquist⁽¹¹⁾ (1981) como *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky), nombre vulgar determinar la estructura y actividad antioxidante de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) "pupa," constancia N° 127-USM-2018.

Obtención del extracto en acetato de etilo

Las hojas secas (500 g) y molidas de *Tristerix chodatianus* se sometieron a extracciones sucesivas por reflujo durante 4 h con el uso de solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo) y se concentraron en un evaporador rotatorio (Buchi R-210, Suiza). Se obtuvieron 60 g del extracto seco en acetato de etilo de color verdoso con un rendimiento de 12 %, el cual dio positivo a la reacción de Shinoda.⁽¹²⁾

Fraccionamiento del extracto acetato de etilo por columna al vacío

El extracto en acetato de etilo se adsorbió en gel de sílice gruesa de 0,2-0,5 mm de diámetro (Merck, Alemania), se colocó en un embudo Buchner y se fraccionó usando vacío adicionándole sucesivamente éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo hasta la ausencia visual del color en los extractos. El extracto en acetato de etilo se concentró en un evaporador rotatorio (Buchi R-210, Suiza) y se obtuvo 48 g de un extracto de color rojizo, que dio positivo a la reacción de Shinoda.⁽¹²⁾

Aislamiento de metabolitos secundarios del extracto de acetato de etilo

El extracto en acetato de etilo (10 g) inicialmente fraccionado por cromatografía de columna usando como soporte Sephadex LH-20, el cual fue suministrado por la empresa Pharmacia Fine Chemicals y la columna se estabilizó con el eluyente éter de petróleo, diclorometano, metanol en proporción 1:2:2.⁽¹³⁾ El extracto en acetato de etilo se colocó como la cabeza de la columna disuelta en el eluyente que se usó durante todo el proceso de fraccionamiento.

Se obtuvieron 48 fracciones por cromatografía en capa fina comparativa (cromatofolios de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, Merck, Alemania),⁽⁸⁾ los que se reunieron en 8 grupos según resultados de la cromatografía en capa fina (CCD) a los que se llamó S₁, S₂, S₃, S₄, S₅, S₆, S₇ y S₈.

La detección de los productos sobre las placas se realizó por fluorescencia con una cámara de luz ultravioleta (Camag) a 254 y/o 360 nm.

El grupo S₄ (fracción 36-42) se fraccionó en una columna cromatográfica, usando gel de sílice fina de 0,063 – 0,200 mm de diámetro Merck.

El grupo S₄ (5 g) se colocó como cabeza de columna adsorbida en gel de sílice gruesa, y la elusión se inició con mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo a la proporción 9:1 y 1:9, mientras que de las mezclas de acetato de etilo metanol de polaridad creciente se obtuvieron 45 fracciones que por cromatografía en capa fina comparativa se reunieron en 6 grupos A, B, C, D, E y F; observándose manchas pronunciadas en los grupos B y E.⁽¹⁴⁾

Tratamiento del grupo B

En este grupo para aislar los metabolitos secundarios presentes se empleó cromatografía preparativa en capa fina (CCFP) y placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm Merck; 120 mg resultaron sembrados en tres placas, 40 mg de muestra en cada una de ellas y se empleó como eluyente una mezcla de éter de petróleo acetato de etilo (2:8).

Una vez eluidas y secas las placas se observaron a la luz ultravioleta y se observaron dos bandas mayoritarias a las que se denominó B₁, B₂ y una casi imperceptible B₃; bandas que fueron redisueltas con metanol y en los compuestos B₁ y B₂ se aislaron como sólidos de color amarillo y dieron positivo a la reacción de Shinoda.

Tratamiento del grupo E

Por CCFP se aisló como producto mayoritario un sólido de color amarillo verdoso que dio positivo a la reacción de Shinoda, al que se denominó E₁.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) del compuesto E₁ se realizó en un espectrómetro Bruker Avance III 300 (300.13 MHz).^(14,15)

Espectroscopia ultravioleta

Los espectros ultravioletas de los compuestos B₁, B₂ y E₁ se efectuaron con el producto disuelto en metanol en un espectrofotómetro UV/VIS CARY 50 BIO, en el intervalo de 200 a 800 nm.^(14,16) El uso de reactivos de desplazamiento permitió identificar la presencia de sustituyentes en la estructura de un flavonoide.^(12,14,16)

Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

Se determinó la actividad antioxidante de los productos obtenidos: B₁, B₂, B₃ y E₁ por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Una porción de los cromatofolios de aproximadamente 20 mg con cada uno de los eluyentes se disolvió en 2 mL de metanol y luego se centrifugó a 3000 rpm por cinco min. Se tomaron 100 µL del sobrenadante el que se adicionó a 2,9 mL de radical DPPH 0,1M en metanol, se agitó y dejó reposar en oscuridad por 30 min, para luego leer la absorbancia de las muestras y blanco correspondiente a 517 nm.^(17,18)

Resultados

En la figura 1, se puede apreciar el espectro ultravioleta (UV) del compuesto B₁ en metanol (MeOH) y MeOH + metóxido de sodio (NaOMe).

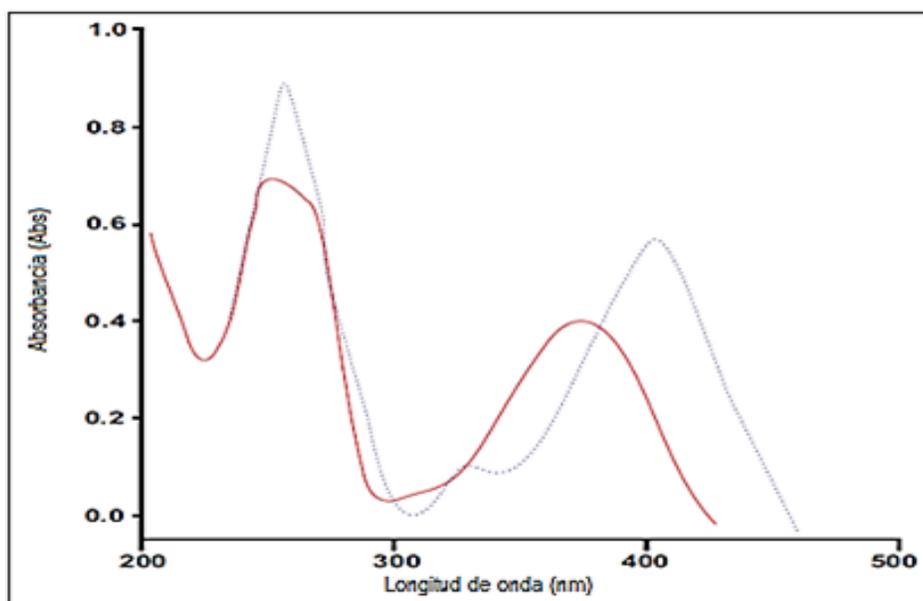


Fig. 1 - Espectro ultravioleta (UV) del compuesto B₁ en metanol (MeOH) y MeOH + metóxido de sodio (NaOMe).

Los valores obtenidos del espectro en MeOH 370 nm estuvieron asociados a la banda I, indicativo de un OH libre en C-3 y 255 nm asociado a la banda II. El desplazamiento batocrómico de la banda I con NaOMe y su posterior descomposición resultó indicativo de la presencia de un hidroxilo libre en C-3 y en C-4 (fig.2).

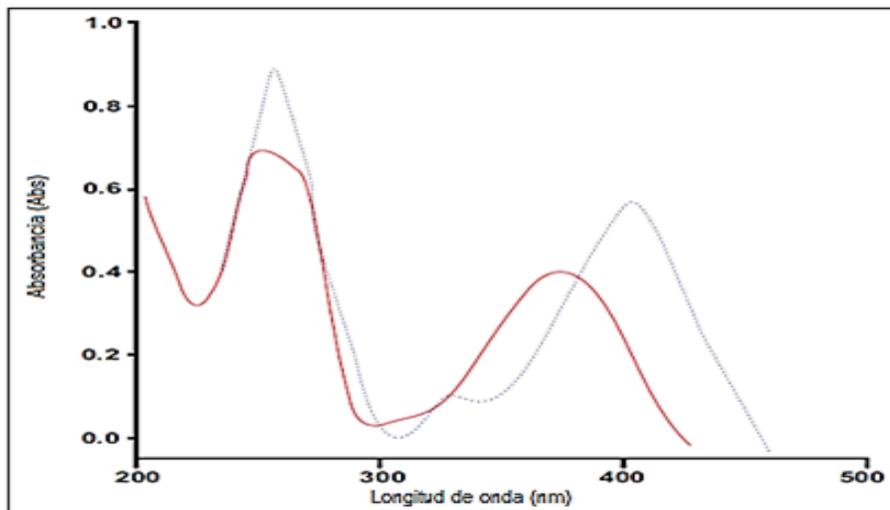


Fig. 2 - Espectro ultravioleta (UV) del compuesto B2 en MeOH y su desplazamiento en NaOMe.

El espectro ultravioleta (UV) mostró las siguientes bandas, 201,9; 207,0; 257 y 359,0 características para un flavonol 3-OH sustituido (fig.3).

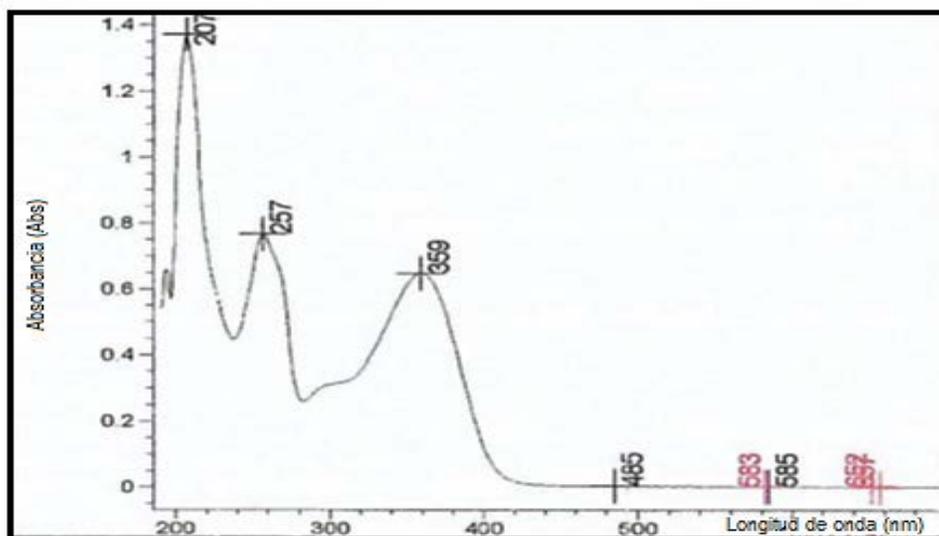


Fig. 3 - Espectro ultravioleta visible (UV-vs) del compuesto E₁, en MeOH.

En lo concerniente a la capacidad antioxidante por el método del radical DPPH se obtuvo un porcentaje de inhibición del 62,2 % para el compuesto B₁; 84 del 7 % para

Discusión

Elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados

La revisión bibliográfica sobre esta especie indicó que la parte más activa de la planta son las hojas y que su extracto de acetato de etilo obtenido por reflujo posee actividad antioxidante y antimicrobiana que se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos.⁽⁵⁾

Los flavonoides han despertado mucho el interés de los investigadores al presentar una gran diversidad de actividades biológicas observadas *in vitro*⁽¹⁹⁾ y ser compuestos polifenólicos con un esqueleto de 15 átomos de carbono con un anillo bencénico fusionado a un anillo cromano (C), el cual está unido a su vez a un segundo anillo aromático (B) que puede estar en la posición dos, tres o cuatro, y diferencias en su estructura química que le confieren características particulares.^(9,20)

La presencia de grupos o-dihidroxi en el anillo B y de un doble enlace entre los carbonos dos y tres, junto con un 4-oxo en el anillo C y de grupos hidroxilo en los carbonos tres y cinco junto con el 4-oxo en los anillos A y C se han asociado a su actividad antioxidante;⁽⁹⁾ al no existir un método de extracción universal que permita la extracción y el aislamiento de los compuestos, objetivos que están influenciados por varios factores como el material vegetal, la preparación de la muestra, el tipo de solvente, la técnica de extracción y las condiciones fisicoquímicas, entre otros.^(10,21)

Compuesto B₁

El compuesto se presenta como un sólido amarillo, soluble en MeOH y en solución acuosa alcalina (color amarillo). Presenta coloración púrpura en la cromatografía en capa fina (CCD) a la luz ultravioleta (Uv/ 366), da positivo (rojo) a la prueba de Shinoda y su espectro Uv en MeOH presenta dos λ_{\max} a 255,5 nm y 350 nm característicos de un compuesto flavonoide de tipo flavonol 3-OH sustituido

(fig.1), además de que dio positivo a la reacción de Molish⁽²²⁾ tras ser sometido a hidrólisis y su coincidencia con el patrón quercitrina permite indicar que se corresponde a esta estructura.^(12,16,23)

Una cromatografía comparativa con muestras de patrón de rutina y quercitrina indicó que el compuesto B₁ presenta el mismo factor de retardo (Rf) que el compuesto quercitrina con valores de Rf: 0,61 para alcohol terbutílico (TBA), 0,58 para el ácido acético glacial (HOAc),^(13,14) por lo que se propone que la estructura del compuesto B₁ corresponde al flavonoide quercitrina.

Compuesto B₂

El compuesto B₂ se presenta como un sólido amarillo, soluble en MeOH, y las soluciones acuosas alcalinas y ácidas de este compuesto son de color amarillo intenso, indicativo de un compuesto flavonoide de tipo flavonol, que se confirmó por la intensificación del color amarillo por exposición del cromatograma a vapores de amoníaco, que dio positiva la prueba de Shinoda (color rojo).

Asimismo, los valores de los espectros UV en MeOH para el compuesto (fig. 2) presentó dos picos máximos de absorción a 255 nm y 370 nm siendo el máximo 370 nm.

Los espectros típicos de los flavonoles presentan dos bandas, la banda A entre 350 y 385 nm y la banda B entre 250 y 290 nm^(16,19,23) y su coincidencia con el patrón de quercetina permitió suponer que se corresponde a esta estructura. Adicionalmente el compuesto B₂ se sometió a CCD (cromatofolio de silicagel 60 F₂₅₄) con una muestra patrón del flavonoide quercetina en cloroformo (CHCl₃): metanol (MeOH) en proporción 9:1 presenta un Rf: 0,4; y en la mezcla alcohol terbutílico: ácido acético: agua en la proporción 30:10:3 presento un Rf: 0,57 y proporcionó los mismos resultados,^(14,24,25) datos que permiten afirmar que la estructura del compuesto B₂ corresponde al flavonoide quercetina.

Compuesto E₁

El compuesto se aisló como un sólido de color amarillo verdoso en una cantidad aproximada de 32 mg, soluble en metanol y en soluciones acuosas alcalinas, dio positivo a la reacción de Shinoda (rojo) y su espectro UV (fig. 3) mostró las siguientes bandas, 201,9; 207,0; 257 y 359,0 características de un flavonol 3-OH sustituido.^(16,19,23) Además presentó ligera diferencia con el espectro del patrón de rutina.

En CCD no se pudo obtener coincidencia de R_f con los patrones usados, por lo que se requirió de los servicios de resonancia magnética nuclear (RMN).

El espectro de RMN ¹H⁽¹⁵⁾ (fig. 4) se tomó disolviendo la muestra en metanol deuterado (MeOD) y se pudo apreciar

- señal doblete δ 1,2 ppm atribuida al grupo metilo del ramnosil,
- entre δ 3 a 4 ppm señales de los diez protones del glicósido ramnoglucosil,
- a δ 4,5 ppm para el H-1 del grupo ramnosil,
- a δ 5,11 ppm señal doblete para un H-1 (protón del glucosil),
- a δ 6,88 ppm y δ 7,64 ppm dos protones dobletes con constante de acoplamiento de 8 (J= 8 Hz) que indica que estos protones están en posición orto entre sí, y se asignaron a los hidrógenos H- 6' y H- 5,
- señal δ 7,66 ppm singulete asignado al H-2', entre a δ 6,39 ppm y δ 6,20 ppm dos protones como singuletes anchos con constante de acoplamiento: (J = 1,7 HZ) indicativo de protones en posición meta entre sí, que corresponden al hidrógeno ocho y seis respectivamente.^(26,27)

El espectro de RMN ¹³C (fig. 5), se realizó disolviendo la muestra en metanol deuterado (MeOD), y en un análisis grosero se pudo apreciar una señal δ entre 67-76 ppm atribuida a los carbonos -CH₃ (primario), carbonos -CH₂ secundarios cíclicos de los azúcares unidos al esqueleto flavonoide.

Asimismo,

- señales de δ entre 94-104 ppm se corresponden a los distintos carbonos CH aromáticos que constituyen el anillo A de la estructura base del flavonoide,
- señales de δ entre 94-104 ppm se corresponde a carbonos (C-C) del anillo heterocíclico,
- señales de δ entre 115-122 ppm se corresponden a carbono (C=C) aromáticos del anillo B, 145 y 148 ppm,
- señales de δ 177,8 se corresponden al carbono cuatro, los que se corresponde con los carbonos (C-OH) aromáticos del anillo en posiciones orto,
- señales de δ entre 156, 157, 161 y 164 ppm se corresponden a los carbonos dos, nueve, cinco y siete, respectivamente y por heterociclo (C=O).^(15,26,27)

La no coincidencia del espectro ultravioleta compuesto y del patrón de rutina puede atribuirse a la presencia de alguna impureza en el compuesto aislado. Sin embargo, los resultados de RNM permite proponer que la estructura del compuesto E1 corresponde al flavonoide rutina.

Los resultados mostrados en la tabla 1 sobre la actividad antioxidante son coincidentes con lo reportado en el año 2003 por Pérez,⁽²⁸⁾ quien al efectuar una revisión en las determinaciones de la actividad antioxidante de los flavonoides encontró que en la mayoría de los métodos usados la quercetina resultó más activa, seguida de la quercitrina y por último la rutina y confirmó que la glicosidación del grupo OH en carbono tres disminuye la actividad antioxidante.⁽²⁹⁾ En la presente investigación acerca de las hojas de la especie *Tristerix chodatianus* se pudieron aislar los flavonoides, quercitrina, quercetina, rutina cuya actividad antioxidante está atribuida al extracto de acetato de etilo relacionada con estos compuestos,⁽³⁰⁾ y al confirmar por técnicas cromatográficas se aislaron tres productos mayoritarios B₁, B₂ y E₁ que se corresponden con la estructura química de los flavonoides, quercitrina (B₁), quercetina (B₂) y rutina (E₁).

La quercetina (B₂) mostró mayor actividad antioxidante que la quercitrina (B₁) y la rutina (E₁), considerados como los principales metabolitos secundarios presentes en la especie investigada relacionados con su demostrada actividad antioxidante, lo que permite concluir que los compuestos en mayoría responsable de la actividad antioxidante del extracto de hojas de *Tristerix chodatianus* son de naturaleza flavonoide.

Referencias bibliográficas

1. Bussmann RW, Sharon D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía - La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Ethnobot. Res. App.* 2018 [acceso 14/09/2021];15:1:293. Disponible en: <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/1281>
2. Carmona I, Murillo JS, Rincón EJ, Alzate FA. Anatomía foliar comparada de *Gaiadendron punctatum* y *Tripodanthus belmirensis* (Loranthaceae). *Acta biol. Colomb.* 2018;23(1):66-72. DOI: [10.15446/abc.v23n1.66598](https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.66598)
3. Gurni AA. Acerca del "quintral". *Dominguezia.* 2012 [acceso 08/07/2021];24;28(1). Disponible en: <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/2811.pdf>
4. Lamilla LA, Robayo CA, Castaño F, Marquínez X, Raz L. Floral anatomy of *Tristerix longibracteatus* (Loranthaceae) *Revista de Biología Tropical.* 2020 [acceso 09/10/2021];68(1): 87-97. DOI: [10.15517/rbt.v68i1.36991](https://doi.org/10.15517/rbt.v68i1.36991)
5. Anicama LC. Evaluación de la Actividad Analgésica y Citotoxicidad del Extracto Etanólico de Hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patsch.) Kujit "Pupa" [tesis en opción de Químico Farmacéutico]. [Ica, Perú]: Universidad San Luis Gonzaga de Ica, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2022. [acceso 30/11/2022] p.12-13 Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/server/api/core/bitstreams/ce5b6a19-988d-4447-acc5-410e51717ebb/content>

6. Camel V, Arizapan M, Pyles M. Using dendrochronology to trace the impact of the hemiparasite *Tristerix chodatianus* on Andean *Polylepis* trees. *Plant Ecol.* 2019;220: 873–86. DOI: [10.1007/s11258-019-00961-w](https://doi.org/10.1007/s11258-019-00961-w)
7. Ames F, Quispe H, Renison D. Conservation status assessment of the highest forests in the world: *Polylepisflavipila* forests as a case study. *Neotropical Biodiversity.* 2021;7(1):160-9. DOI: [10.1080/23766808.2021.1920295](https://doi.org/10.1080/23766808.2021.1920295)
8. Arora S, Itankar P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Chenopodium album* aerial parts. *J Tradit Complement Med.* 2018;8(4):476-82. DOI: [10.1016/j.jtcme.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.002)
9. Kumar BR. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *J Pharm Anal.* 2017;7(6):349-64. DOI: [10.1016/j.jpha.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.005)
10. Tushar D, Sonal SNA, Gajbhiye SK. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian J Chem.* 2017;(10):S1193-99. DOI: [10.1016/j.arabjc.2013.02.015](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015)
11. Cronquist A. The divisions and classes of plants. *Bot. Rev.* 1960;26:425–82. DOI: [10.1007/BF02940572](https://doi.org/10.1007/BF02940572)
12. Kitahiro Y, Ikeda H, Im HT, Kodaira E, Shibano M. Phytochemical characterization of *Rosa multiflora* Thunb. (Rosaceae) in Japan and South Korea, with a focus on the bioactive flavonol glycoside 'multiflorin A'. *J Nat Med.* 2019;73(3):555-65. DOI: [10.1007/s11418-019-01302-x](https://doi.org/10.1007/s11418-019-01302-x)
13. Liu G, Rajesh N, Wang X, Zhang M, Wu Q, Li S, *et al* Identification of flavonoids in the stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Chromatography B.* 2011;879(1314):1023-28. DOI: [10.1016/j.jchromb.2011.02.050](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.02.050)
14. Yuzhi L, Chengying Z, Chang L, Shuaishuai Z, Guifang T, Lili H, *et al*. Simultaneous determination of 14 bioactive citrus flavonoids using thin-layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy, *Food Chemistry.* 2021;338:128115. DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.128115](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128115)

15. Formisano C, Rigano D, Lopatriello A, Sirignano C, Ramaschi G, Arnoldi L, *et al.* Detailed Phytochemical Characterization of Bergamot Polyphenolic Fraction (BPF) by UPLC-DAD-MS and LC-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(11):3159-67 DOI: [10.1021/acs.jafc.8b0659](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b0659)
16. Wong K. Review of Spectrometric Identification of Organic Compounds. *J. Chem. Educ.* 2015;92(10):1602-03. DOI: [10.1021/acs.jchemed.5b00571](https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00571)
17. Mad NA, Nusrat JB, Rafiquzzaman Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;21(2):143-52. DOI: [10.1016/j.jsps.2012.05.002](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002)
18. Baliyan S, Mukherjee R, Priyadarshini A, Vibhuti A, Gupta A, Pandey RP, *et al.* Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*. 2022;27(4):1326. DOI: [10.3390/molecules27041326](https://doi.org/10.3390/molecules27041326)
19. Zhou T, Guo W, Ren S, Li Y, Wu J, Yang B. Flavonoid glycosides and other bioactive compounds in Citrus reticulata 'Chachi' peel analyses by tandem mass spectrometry and their changes during storage, *Carbohydrate Research*. 2021;510:108462 DOI: [10.1016/j.carres.2021.108462](https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108462)
20. Blunder M, Orthaber A, Bauer R, Bucar F, Kunert O. Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments. *Food Chemistry*. 2017:600–09. DOI: [10.1016/j.foodchem.2016.09.077](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.077)
21. Kostikova VA, Chernonosov AA, Kuznetsov AA, Petrova Nevada, Krivenko DA, *et al.* Identificación de Flavonoides en las Hojas de *Eranthis longistipitata* (Ranunculaceae) por Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas de Alta Resolución (LC-HRMS). *Plantas*. 2021;10:2146. DOI: [10.3390/plants1010214](https://doi.org/10.3390/plants1010214)
22. Arias S, López D. Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria. *Lámpsakos*. 2019;22:123-36. DOI: [10.21501/21454086.3252](https://doi.org/10.21501/21454086.3252)

23. Subhi M, Clavijo S, Cerda V. Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples, TrAC Trends. Analytical Chemistry. 2021;138:116220 DOI: [10.1016/j.trac.2021.116220](https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116220)
24. Fichou D, Morlock GE. Quan TLC, an online open-source solution for video densitometric quantification, Journal of Chromatography A. 2018;1560:78-81 DOI: [10.1016/j.chroma.2018.05.027](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.027).
25. Fougère L, Da Silva D, Destandau E, Elfakir C. TLC-MALDI-TOF-MS-based identification of flavonoid compounds using an inorganic matrix. Phytochem Anal. 2019;30(2):218-25. DOI: [10.1002/pca.2807](https://doi.org/10.1002/pca.2807)
26. Jensen A, Lund PN, Brown PR. Shipley A. Quantification of North American and European Crataegus flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry, Fitoterapia. 2020;143:104537 DOI: [10.1016/j.fitote.2020.104537](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104537)
27. Olech M, Pietrzak W, Nowak R. Characterization of Free and Bound Phenolic Acids and Flavonoid Aglycones in Rosa rugosa Thumb. Leaves and Achenes Using LC-ESI-MS/MS-MRM Methods. Molecules. 2020;25:1804. DOI:[10.3390/molecules25081804](https://doi.org/10.3390/molecules25081804)
28. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cub Invest Bioméd. 2003 [acceso 14/09/2024];22(1) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007&lng=es
29. Marques JM, Francisco CFM, Cunha de Almeida J, da Silva MD, Rodrigues de Moraes BJ, Ferreira DC, et al. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. Natural Prod Research. 2020;34(5):692-705 DOI: [10.1080/14786419.2018.1493588](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588)
30. Tzanova M, Atanasov V, Yaneva Z, Ivanova D, Dinev T. Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. Processes. 2020;8:1222. DOI: [10.3390/pr8101222](https://doi.org/10.3390/pr8101222)

Conflicto de intereses

Los autores declararan que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Junior Medrano Alvites, Eneydo Huamani García, Santos Haydee Chávez Orellana, Felipe Artemio Surco Laos.

Curación de datos: Junior Medrano Alvites, Eneydo Huamani García, Santos Haydee Chávez Orellana.

Análisis formal: Santos Haydee Chávez Orellana, Alfredo. Manuel Valle Campos, Eddie Loyola Gonzales.

Investigación: Junior Medrano Alvites, Eneydo Huamani García, Felipe Artemio Surco Laos.

Metodología: Junior Medrano Alvites, Eneydo Huamani García, Santos Haydee Chávez Orellana, Manuel Alfredo Valle Campos.

Administración del proyecto: Santos Haydee Chávez Orellana, Manuel Alfredo Valle Campos, Eddy Loyola Gonzales.

Supervisión: Manuel Alfredo Valle Campos, Eddy Loyola Gonzales, Santos Haydee Chávez Orellana.

Validación – Verificación: Junior Medrano Alvites, Eneydo Huamani García, Santos Haydee Chávez Orellana, Felipe Artemio Surco Laos.

Visualización: Santos Haydee Chávez Orellana, Manuel Alfredo Valle Campos, Eddy Loyola Gonzales.

Redacción - borrador original: Junior Medrano Alvites, Eneydo Huamani García, Santos Haydee Chávez Orellana, Felipe Artemio Surco Laos.

Redacción - revisión y edición: Santos Haydee Chávez Orellana, Felipe Artemio Surco Laos.