



**Identificación de fitoconstituyentes y caracterización de flavonoides en las inflorescencias de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor” por Cromatografía líquida de alta resolución-Espectrometría de masas**

**Phytoconstituents identification and flavonoids characterization from *Brassica oleracea var. Botrytis* “cauliflower” inflorescences by High performance liquid chromatography- Mass spectrometry**

Anabel González Siccha<sup>1</sup>, Carlos Sabana Gamarra<sup>2</sup>.

Recibido: 08 de junio del 2015; Aceptado: 30 de julio del 2015

**RESUMEN**

**Objetivo:** Identificar los fitoconstituyentes y caracterizar los flavonoides presentes en la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor” por cromatografía líquida de alta resolución/Espectrometría de masas. **Material biológico:** Coliflor recolectada en Simbal-Trujillo. **Método:** Identificación cualitativa de los fitoconstituyentes por separación con solventes de polaridad creciente (éter, etanol y agua) mediante Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC) y por el espectro de masas (MS/MS). Se caracterizaron los productos de los flavonoides obtenidos después de hidrólisis ácida y alcalina. **Resultados:** Las inflorescencias de la coliflor presentaron metabolitos secundarios como: glucosinolatos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. En el análisis de HPLC-MS/MS, se obtuvo el tiempo de retención (Rt) de los flavonoides glicosilados, identificados como derivados acilados (R-CO-): quercetin-3-diglucósido-7-diglucósido (Rt= 12.3) y quercitina-7-glucósido (Rt=18.0). En hidrólisis ácida, el kaempferol-3-diglucósido-7-glucósido (Rt=15.5), produjo kaempferol, aglicona y componentes de hidrólisis parcial: kaempferol-7-glucósido (Rt=38.1), kaempferol-3-diglucósido (Rt=34.9) y otros diglucósidos de kaempferol. Con la hidrólisis alcalina se obtuvieron flavonoides glicosilados que coinciden con kaempferol-3-diglucósido (Rt=34.9). **Conclusión:** Las inflorescencias de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor” contienen fitoconstituyentes como: glucosinolatos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides, caracterizados como kaempferol y quercitina glicosilados, siendo la quercitina el flavonoide que se presenta en altas cantidades.

**Palabras Clave:** *Brassica oleracea L. var. Botrytis*; fitoconstituyentes; HPLC; flavonoides glicosilados; quercitina.

**ABSTRACT**

**Objective:** To identify and characterize phytoconstituents flavonoids in the inflorescence of *Brassica oleracea L. var. Botrytis* "Cauliflower" by High performance liquid chromatography and Mass spectrometry. Biological material: Cauliflower collected in Simbal-Trujillo. **Method:** Qualitative identification of phytoconstituents present in the inflorescence by separation with increasing polarity solvents (ether, ethanol and water) by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectra (MS / MS), characterization was performed on the products of flavonoids obtained after acid and alkaline hydrolysis. **Results:** The cauliflower inflorescences presented secondary metabolites as glucosinolates, steroids, saponins, tannins and flavonoids. In the analysis of HPLC-MS / MS was obtained retention time (Rt) of glycosylated flavonoids, identified as acylated derivatives ( R- CO-): Quercetin -

<sup>1</sup> Docente del Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

\*Autor para correspondencia: [agonzalez@unitru.edu.pe](mailto:agonzalez@unitru.edu.pe)

3 - diglucoside -7 - diglucoside (  $R_t = 12.3$  ) and quercetin -7 - glucoside (  $R_t = 18.0$  ) . In acid hydrolysis, kaempferol -3 - diglucoside -7 - glucoside (  $R_t = 15.5$  ) , produced kaempferol , aglycone and partial hydrolysis components as kaempferol -7 - glucoside (  $R_t = 38.1$  ) , kaempferol -3 - diglucoside (  $R_t = 34.9$  ) and other di- kaempferol . With alkaline hydrolysis was obtained glycosylated flavonoids kaempferol -3 - diglucoside (  $R_t = 34.9$  ) . **Conclusion:** The inflorescence of *Brassica oleracea L. var. Botrytis* "cauliflower" contains secondary metabolites as glucosinolates, steroids, saponins, tannins and flavonoids that were characterized as kaempferol and glucosyl quercetin being quercetin flavonoid presented in high amounts.

**Key words:** *Brassica oleracea L. var. Botrytis*, phytoconstituents, flavonoids glycosylated, quercetin, HPLC-MS/MS.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas desde la antigüedad han sido un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y curaciones de sus enfermedades, estas últimas denominadas plantas medicinales. Es frecuente, utilizar la tradición y el conocimiento acumulado durante generaciones, de algunas plantas para justificar la inocuidad y su efecto en el organismo<sup>1</sup>.

Las plantas producen diversos tipos de compuestos que se han clasificado en dos grandes grupos: metabolitos primarios, encargados de los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, asimilación de nutrientes y diferenciación. A este grupo pertenecen la clorofila, los aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos simples y lípidos de membrana; y los metabolitos secundarios, los cuales no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta y presentan una distribución restringida en el reino vegetal, terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados pertenecen a este grupo<sup>2</sup>.

En la actualidad, a varios productos naturales, se les atribuye propiedades medicinales; por ejemplo, algunas investigaciones manifiestan que se previene el cáncer con la mayor ingesta de verduras crucíferas, como coliflor, repollo y brócoli, que son ricas en nutrientes como: carotenoides, vitaminas C, E, K, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, minerales y flavonoides<sup>3,4</sup>. Estudios realizados en ratas inducidas como 1,2-dimethylhydrazine, demostraron que el extracto de "broccoli", contrarresta el crecimiento y la proliferación celular, y previene la pérdida de peso corporal<sup>5</sup>.

Estudios recientes han demostrado las actividades biológicas relevantes de compuestos fenólicos con actividad antioxidante y lo relacionan con su estructura química que les confiere propiedades redox<sup>6</sup>. Ellos pueden intervenir en la adsorción y neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS), como mecanismos de defensa contra infección y el daño oxidativo, sin embargo la generación excesiva de ROS pueden dañar el tejido o moléculas intracelulares, que conducen a la acumulación de peróxidos de lípidos. Este estrés oxidativo se ha relacionado al cáncer, el envejecimiento, la aterosclerosis, la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas<sup>7</sup>.

Por su acción protectora y la incapacidad del organismo humano de producir los flavonoides, estos merecerían ser incorporados al grupo de nutrientes esenciales. Se ha manifestado que la coliflor, una variedad de la especie *Brassica oleracea L.* en el grupo *Botrytis*, contiene flavonoides con propiedades antioxidantes<sup>8</sup>, anti-inflamatorias<sup>9</sup> y anti-cancerígenas<sup>10</sup>, importantes en la prevención de muchas enfermedades ya sea cardiovasculares, oncológicas etc<sup>3</sup>.

Sin embargo, los metabolitos secundarios, entre ellos, los flavonoides, no están aún bien caracterizados, y comprendidos por los investigadores.

Por lo cual, se hace necesario, la identificación de los fitoconstituyentes y los componentes flavonoides presentes en la inflorescencia de la coliflor, como una forma de proponer subproductos que con sustento científico se le atribuya propiedades

medicinales en beneficio de las personas.

Por lo expuesto, se planteó, lo siguiente:

¿Cuáles son los fitoconstituyentes y flavonoides caracterizados por HPLC-MS/MS que contiene la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor”?

## OBJETIVOS

1. Identificar los fitoconstituyentes presentes en la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var Botrytis* “coliflor” por separación con solventes de polaridad creciente.
2. Caracterizar los flavonoides en la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var Botrytis* “coliflor” por HPLC-MS/MS.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Objeto de estudio:

- **M. Vegetal:** *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor” procedentes del C.P. Pedregal-Simbal, e identificadas según la taxonomía reportado por Mostacero-León *et al.*<sup>11</sup>.

### Medios:

- **De Vidrio:** Uso común Laboratorio de Farmacognosia y Química.
- **Aparataje:** Uso común Laboratorio de Farmacognosia y Química Orgánica. Para el HPLC, se usó la columna Athena C18 250X 4.6, a temperatura de 35°C, cuya relación en la fase móvil fue 55: 45 % v/v. Series 200 UV/Vis PDA.
- **Reactivos:** fueron usados de grado analítico.

### Métodos y técnicas: Tratamiento del vegetal *Brassica oleracea L. var. Botrytis*

- **Identificación de metabolitos:** Se pesaron 1000 g de inflorescencia cruda de coliflor, con características organolépticas óptimas, se lavaron y secaron a temperatura ambiente por 24 horas; luego fueron desecadas a 40°C en la estufa. La identificación de los metabolitos fue basada en la separación con solventes de polaridad creciente (éter, etanol y agua) y la identificación cualitativa con reactivos de coloración y precipitación<sup>12</sup>.
- **Obtención de flavonoides en las inflorescencias de *Brassica oleracea L.***

**var. *Botrytis* “coliflor”:** Protocolo reportado por Ruiz-Reyes<sup>13</sup>.

Fueron pulverizadas 100 g de inflorescencias y colocadas en un cartucho de un equipo Soxhlet que contienen la mezcla Etanol/ácido sulfúrico 10% v/v en la proporción 1:1 durante 52 horas, y la mezcla obtenida fue colocada en Baño María para volatizar el etanol, obteniéndose un extracto acuoso-ácido que fue refrigerado a 10°C por 24 horas. Luego, el extracto fue filtrado al vacío y lavado con agua helada, midiendo el pH hasta casi neutro; obteniéndose un precipitado, libre de azúcares.

El precipitado obtenido fue purificado, colocándolo en un papel de filtro, desecado en la estufa a 37 °C por 24 horas y solubilizado en etanol caliente de 96° Gay Lussac a 50°C con 100 ml de agua destilada; obteniéndose los flavonoides, proceso que se repite por tres veces. Los flavonoides recristalizados y purificados se almacenaron en un frasco de color ámbar para su protección de la luz solar.

- **Caracterización de los flavonoides:**

**Fundamento:** Fue realizado por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa a temperatura ambiente y con una gradiente de solventes acoplada a espectrometría de masas en línea con fuente de ionización (HPLC-MS/MS), en los productos obtenidos después de una hidrólisis alcalina o ácida, midiendo el tiempo de retención y según las transiciones de los pesos moleculares sin fragmentar y fragmentados de cada compuesto, utilizando el método reportado por Vallejo *et al.*<sup>14</sup> y Gratacós-Cubarsí *et al.*<sup>15</sup>.

- 

**Procedimiento:** Se pesaron 100 g de las inflorescencias de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor”, se congelaron a -70 °C, se liofilizaron y molieron hasta polvo fino, almacenándose a -20 °C para su posterior análisis.

Se pesaron 70 g de muestra, y se extrajeron los subproductos por ebullición con 3 L de agua destilada durante 60 min. A continuación, este extracto acuoso se mezcla con partículas Amberlite XAD-2,

en cantidad suficiente para llenar una columna de 55 cm x 4 cm, agitándose durante 4 h a temperatura ambiente para retener los compuestos fenólicos en la superficie de las partículas Amberlite no iónicas. Las partículas Amberlite fueron empaquetados en una columna de cromatografía, se lavó con agua destilada (5 L), y los compuestos fenólicos absorbidos fueron eluidos con metanol (1 L). El extracto de metanol se llevó a sequedad y se volvió a disolver en metanol/agua (1:1v/v) para la cromatografía en una columna Sephadex LH- 20 (40 cm×3 cm), a una temperatura de 35°C. La elución de las diferentes fracciones fenólicas fue seguido bajo luz UV (254 y 360 nm). Las primeras fracciones de elución contenían las moléculas más grandes de flavonoides, seguidos por los de compuesto intermedio tamaño, y terminando con los compuestos naturales más pequeños. Las fracciones eluidas fueron cromatografiadas por HPLC semipreparativa para aislar los diferentes constituyentes. Esto se realizó en una columna 25 x 1cm Lx i.d., de 5 micras Spherisorb ODS-2, isocráticamente, con diferentes mezclas de metanol/agua. La pureza de los compuestos aislados fue seguido por HPLC analítica, usando una columna C18 de 25x0.4 cm i.d., 5 micras LiChroCART (Merck, Darmstadt, Germany) y agua como fases móviles + 5 % HCOOH (A) y metanol (B ) con un flujo del caudal de 1 mL/min , comenzando con 10 % de B hasta alcanzar el 20% B después de 25 min, 50 % B en las 40 min, 50 % B en 45 min, 90 % B en 46 min y 90 % B en 50 min.

Los Cromatogramas UV se registraron a 330 nm. Los compuestos aislados se secaron por congelación para su almacenamiento.

- **Hidrólisis Alcalina:** La hidrólisis alcalina, se realizó mediante la adición de 1 ml de NaOH 4N al extracto fenólico purificado (1 ml) y se mantuvo la mezcla durante 16 h a temperatura ambiente, en un tubo de ensayo con tapón en atmósfera de N<sub>2</sub>. Después de este paso, los productos de hidrólisis alcalinas se acidificaron con

HCl concentrado (cambio de color concentrada hasta pH 1-2) y directamente analizado por HPLC -DAD -MS / MS.

- **Hidrólisis Ácida:** La solución anteriormente obtenido por hidrólisis ácida parcial se mantuvo en un tubo de ensayo tapado a 75°C por 30 minutos, y analizada por HPLC -DAD -MS / MS. La hidrólisis ácida total se llevó a cabo mediante la adición de 1 ml de HCL 4N a 1 ml de la solución de metanol de los diferentes productos aislados (v/v), en un tubo de ensayo con tapón a 90°C durante 45 minutos Los productos de la hidrólisis fueron analizados por directamente analizados por HPLC -DAD -MS / MS.
- **Estudio de la hidrólisis de los productos:** Los diferentes ácidos orgánicos liberados después de la hidrólisis se identificaron por HPLC - DAD- MS comparándolos con patrones. Los azúcares se identificaron mediante TLC utilizando diferentes azúcares como normas. Las agliconas de flavonoides fueron identificados por medios espectroscópicos Análisis UV, utilizando alcalinos y metales reactivos y HPLC -DAD -MS.
- **HPLC-DAD-MS / MS ESI:** El sistema utilizado para los análisis cualitativos fue HPLC Agilent equipado con un detector de arreglo de diodos y detector de masas en serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La HPLC consistió en una bomba binaria (G1312A), un muestreador automático (G1313A), un desgasificador (G1322A), y un detector de matriz de fotodiodos (G1315B). El sistema de HPLC fue controlado por un software ChemStation (Agilent, v. 08,03). La masa detector fue un espectrómetro de trampa de iones (G2445A) con sistema de ionización por electro spray y fue controlado con el software LCMSD (Agilent, v. 4.1). Las condiciones de ionización se ajustaron a 350 °C y 4 kV para la temperatura y el voltaje capilar, respectivamente. La presión nebulizadora y el nivel de flujo de nitrógeno fueron 65,0 psi y 11 L/ min respectivamente. El análisis de masa completa varió de 200-2000 m/z. Se utilizó helio como gas de colisión para los experimentos de fragmentación y la energía de colisión se

ajustó al 100 %. Todos los datos de espectrometría de masas fueron registrados en el modo negativo.

Total de cromatogramas de iones eran registran como eventos de análisis automático de dos alternantes: masa análisis completo espectros (MS) y MS / MS para la fragmentación de los más abundantes iones pseudomoleculares.

• **Análisis cualitativos por espectroscopía de masas de los compuestos aislados:**

Como detector de masa se utilizó un espectrómetro Agilent con trampa de iones (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El análisis de Espectroscopía de Masas en los compuestos aislados fue realizado por infusión constante de un sistema de ionización por electrospray. Los compuestos aislados se disolvieron en agua/metanol (50:50, v/v). La velocidad de flujo de la infusión constante era 10 L/min. La tensión capilar y la temperatura fueron 4 kV y 300 °C, respectivamente. La presión del nebulizador fue 15 psi, y el flujo de nitrógeno fue de 5 L/min. Los compuestos aislados se sometieron a hasta cinco eventos de manera secuencial, dependiendo del peso molecular de los compuestos (MS) para encontrar iones pseudomolecular, (MS/MS) y para la fragmentación del ión pseudomolecular (MS<sub>n</sub>, n) hasta 5, en orden a los principales iones fragmentados obtenidos en cada paso.

## RESULTADOS

**Tabla 1.** Identificación de los fitoconstituyentes presentes en la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor”

| Metabolitos secundarios            | ENSAYO               | RESULTADO |
|------------------------------------|----------------------|-----------|
|                                    | Mayer                | Negativo  |
| Alcaloides                         | Dragendorff          | Negativo  |
|                                    | Wagner               | Negativo  |
| Antraquinonas                      | Bortranger           | Negativo  |
| Esteroides                         | Lieberman-Bouchardat | Positivo  |
| Flavonoides                        | Shinoda              | Positivo  |
| Glucósidos (compuestos reductores) | Fehling              | Positivo  |
| Saponinas                          | Espuma               | Positivo  |
| Taninos                            | FeCl <sub>3</sub>    | Positivo  |
|                                    | Gelatina             | Positivo  |

Fuente: Datos obtenido por el autor

**Tabla 2.** Caracterización e Identificación de los flavonoides obtenidos de la inflorescencia de *Brassica oleracea L.var. Botrytis* “coliflor”

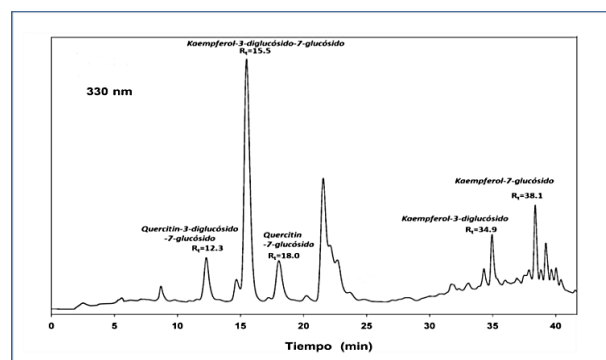
| Estructura del Flavonoide                           | Rt (min) | UV (nm)           | [M-H] <sup>-</sup> (m/z) | MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup> (m/z) | MS <sup>3</sup> [M-H] <sup>-</sup> (m/z) |
|---|----------|-------------------|--------------------------|--|--|
| Quercitina-3-diglucosido-7-diglucosido <sup>a</sup> | 12.3     | 255, 266Sh, 354   | 787                      | 625                                      | 462                                      |
| Kaempferol-3-diglucosido-7-diglucosido <sup>a</sup> | 15.5     | 267, 293sh, 348   | 771                      | 610                                      | 429                                      |
| Quercitina-7-glucosido <sup>b</sup>                 | 18.0     | 252, 269sh, 301sh | 993                      | 831                                      | 625                                      |
| Kaempferol-3-diglucosido <sup>b</sup>               | 34.9     | 268, 298sh        | 609                      | 429                                      | 284                                      |
| Kaempferol-7-glucosido <sup>b</sup>                 | 38.1     | 265, 255sh        | 447                      | 285                                      |  |

Fuente: Datos obtenido por el autor

**Rt:** Tiempo de Retención

**a** Flavonoides glicosilados identificados por HPLC-MS/MS

**b** Productos obtenidos después de una hidrólisis ácida o alcalina por HPLC.



**Figura 1:** Cromatograma HPLC de los flavonoides obtenidos de *Brassica oleracea L. var. Botrytis*, se muestra la presencia de Quercitina y Kaempferol, siendo la quercitina el flavonoide que se encuentra en mayor cantidad.

## DISCUSIÓN

En la tabla 1, se muestra que las inflorescencias de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* contienen fitoconstituyentes secundarios como glucosinolatos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. Los glucosinolatos (también llamados tioglucósidos) son S-glicósidos en los que la glicona es b-D-tioglucona y la aglicona es una oxima sulfatada, son especialmente abundantes en la familia de las crucíferas<sup>16</sup>. Los glucosinolatos que cumplen la función de defensa de las plantas son los tioglucósidos que son derivados del ácido amino<sup>17</sup>, por

hidrólisis se obtienen compuestos biológicamente activos como isotiocianatos sulfuranos y tiocianatos<sup>16</sup>. Una gran variedad de esteroides, son sintetizados por las crucíferas, algunos de ellos poseen función hormonal y otros participan en los mecanismos de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos que infectan al hombre o a los animales<sup>18</sup>. A las saponinas se le atribuye propiedades detergentes<sup>7</sup> y los taninos son compuestos fenólicos de sabor áspero y amargo, con propiedades astringentes<sup>2</sup>.

Los flavonoides representan la mayor clase de polifenoles y se sintetizan por la ruta del ácido shikímico<sup>7</sup>, los cuales se le atribuye propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas y antitumorales<sup>19</sup>.

En la tabla 2, se muestra el análisis de los compuestos fenólicos obtenidos de la inflorescencia de coliflor por HPLC/UV-DAD, observando su espectro UV, sugiere que son polifenoles glicosilados como quercetin-3-diglucósido-7-diglucósido (Rt=12.3) y kaempferol-3-diglucósido-7-glucósido (Rt=15.5), al ser analizados producen glucósidos, kaempferol y quercitina; siendo la quercitina el flavonoide que se presenta en altas cantidades.

La Quercitina-3-diglucósido-7-diglucósido y quercitina-7-glucósido (Rt=18.0) fueron identificados como derivados acilados obteniendo residuos acilados de quercitina y glucósidos. El kaempferol-3-diglucósido-7-glucósido fue analizado por hidrólisis ácida produciendo kaempferol, aglicona y componentes de hidrólisis parcial, kaempferol-7-glucósido (Rt=38.1), kaempferol-3-diglucósido (Rt=34.9) y otros diglucósidos de kaempferol. En la hidrólisis alcalina se produce flavonoides glicosilados que coinciden con el kaempferol-3-diglucósido (Rt=34.9).

En las especies *Brassica*, los principales flavonoides encontrados son quercitina y kaempferol como O- glucósidos conjugados principalmente a la glucosa, y acilados con ácido hidroxicinámico<sup>14,15</sup>.

En la figura 1, se observa que el cromatograma HPLC de los flavonoides obtenidos en las inflorescencias de la coliflor,

demostrando la presencia de quercitina y kaempferol, siendo la quercitina el flavonoide que se encuentra en mayor cantidad

Gratacós-Cubarsí *et al*, han demostrado mediante la evaluación simultánea de los glucosinolatos intactos y compuestos fenólicos por UPLC-DAD-MS/MS que la coliflor contiene flavonoides como: quercetina-3-diglucósido-7-glucósido, kaempferol-3-diglucósido-7-glucósido y kaempferol-3-diglucósido-7-diglucósido<sup>15</sup>.

**Conclusión:** El extracto obtenido de las inflorescencias de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* contiene fitoconstituyentes secundarios como glucosinolatos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides que al caracterizarlos por HPLC-MS/MS se encontró la presencia de kaempferol y quercitina glucosilados; a los cuales se les podría atribuir las propiedades antioxidante y antitumoral.

#### Conflicto de interés

No se presentan conflictos de interés.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bruneton J. Plantas tóxicas vegetales peligrosas para el hombre y los animales. España. Editorial Acribia S.A.; 2005:14-20.
2. Ávalos-García A, Pérez-Urria C. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2009; 2(3):119-145. ISSN: 1989-3620.
3. Hayes J, Kelleher M, Eggleston I. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*, 2008; 47(2):73-88.
4. Eid N, Walton G, Costabile A, Kuhnle G, Spencer J. Polyphenols, glucosinolates, dietary fibre and colon cancer: Understanding the potential of specific types of fruit and vegetables to reduce bowel cancer progression. *Nutrition and Aging*, 2013; 2 (2013/2014):45-67. DOI 10.3233/NUA-130029.UK.
5. Guzmán L, Irigoien S. Efecto de las inflorescencias de *Brassica oleracea var. Itálica* "brocolí" sobre cáncer de colon

- inducido por 1,2-dimetilhidrazina en *Rattus norvegicus* var. *albinus*. Tesis para optar grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica- Fac. Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, 2012. 33 pp.
6. Fernández-León M, Fernández-León A, Lozano M, Ayuso M, González J, González-Gómez D. Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante en Brassicas. *Actas de Horticultura*, 2011; 58:191-194
  7. Cartea M, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 2011; 16(1):251-280.
  8. Vásquez-Garzón V, Arellanes-Robledo J, García-Roman R, Aparicio-Rautista D, Villa-Treviño S. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free radical research*, 2008; 43(2):128-137.
  9. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner A, Stachurska A, Jozkowicz A. *et al.* Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem*, 2010; 22:293-299.
  10. Choi E, Bae S, Ahn W. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res*, 2008; 31(10):1281-5. doi:10.1007/s12272-001-2107-0.
  11. Mostacero-León, J., Mejía, F., Gamarra, O. Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Vol. I. Editorial Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). 2002. Registrado en la Biblioteca Nacional del Perú con certificado de Depósito Legal N° 1301012002 - 0438. Perú. Pp.266-67.
  12. Lock-Ugáz O. Manual de Fitoterapia. Capítulo IV Perú. Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 2010. pp 41-64.  
<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manuales/MEC/fitoterapia/cap4>
  13. Ruiz-Reyes G. Métodos de Extracción de Flavonoides. Trabajo de Habilitación, para ingreso a la Docencia en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 2002. 13-20 pp.
  14. Vallejo F, Tomás-Barberán F, Ferreres F. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography – UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004; Vol 1054(1–2)(29):181-193.
  15. Gratacós-Cubarsí M, Ribas-Agustín A, García-Regueiro, J, Castellari M. Analytical Methods: Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*. *Food Chemistry*, 2010; Vol 121 (1): 257–263.
  16. Rincón- Pérez, A. Biosíntesis de los Glucosinolatos e Importancia Nutricional Humana y Funciones de Protección a las Plantas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de alimentos*, 2014. Vol 22, No 31:64-80.
  17. Basu N , Kumar M, Chaudhury, Ghosh R. Trichloroisocyanuric Acid (TCCA): an efficient green reagent for activation of thioglycosides toward hydrolysis, *Carbohydrate Research*, 2013; Vol. 369 (22):10-13.
  18. Castilla V, Ramírez J. y Coto C. Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Revista Química Viva*, 2009. Vol 1 (8):1-6
  19. Pérez-Vizcaino F, Duarte J, Jiménez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 2009; 61:67–75.