



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Cuantificación y caracterización de flavonoides
totales presentes en el fruto de tejocote de la
especie *Crataegus mexicana*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RODOLFO MARTÍNEZ DE ANDA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

1er Suplente: Dr. Arturo Navarro Ocaña

2º Suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Conjunto de Investigación E.

Edificio de Bioquímica y Farmacia.

Laboratorio 111.

Facultad de Química, UNAM.

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Rodolfo Martínez De Anda



Lista de cuadros	v
Lista de diagramas	v
Lista de figuras	vi
Lista de abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Nombres comunes	3
2.1.1. Sinonimia botánica	3
2.2. Categoría taxonómica de <i>Crataegus mexicana</i>.....	3
2.3. Descripción.....	4
2.3.1. Descripción macroscópica de <i>Crataegus mexicana</i>	4
2.3.2. Descripción microscópica de <i>Crataegus mexicana</i>	6
2.4. Origen del género <i>Crataegus</i>	7
2.5. Distribución geográfica de <i>Crataegus mexicana</i>	10
2.6. Historia de <i>Crataegus mexicana</i>	11
2.7. Usos de <i>Crataegus mexicana</i>	13
2.7.1. Etnobotánica	13
2.7.1.1. Formas de dosificación a nivel popular	14
2.7.2. Usos no medicinales	16
2.8. Composición química del fruto del género de <i>Crataegus</i>.....	16
2.9. Farmacología del género <i>Crataegus</i>.....	21
2.10. Estrés oxidativo	24
2.10.1. Radicales libres y especies reactivas	24
2.10.1.1. Origen.....	26
2.10.1.2. Efectos nocivos	27
2.10.3. Sistema de defensa contra el estrés oxidativo	28
2.10.3.1. Sistemas enzimáticos.....	28
2.10.3.2. Sistemas no enzimáticos.....	31
2.10.4. Antioxidantes.....	33



2.10.4.1 Clasificación	34
2.10.4.2 Actividad antioxidante de flavonoides <i>in vitro</i>	36
2.10.4.2.1. Atrapamiento directo de ROS.....	37
2.10.4.2.2. Habilidad de activar enzimas antioxidantes.....	41
2.10.4.2.3. Actividad quelante de metales.....	43
2.10.4.2.4. Reducción de radicales α -tocoferol	44
2.10.4.2.5. Capacidad de inhibir oxidasas.....	45
2.10.4.2.6. Modulación del estrés oxidativo causado por óxido nítrico.....	46
2.10.4.2.7. Aumento en los niveles de ácido úrico	48
2.10.4.2.8. Modificación de las propiedades prooxidantes de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular	49
2.10.4.3. Metabolismo de flavonoides y actividad antioxidante de sus metabolitos <i>in vitro</i>	49
2.10.4.4. Actividad antioxidante de flavonoides <i>in vivo</i> y sus metabolitos	52
2.10.4.5. Función prooxidante directa de los flavonoides.....	54
2.10.4.6. Oxidación por radicales fenoxil de flavonoides.....	57
2.10.4.7. Inhibición de la respiración mitocondrial.....	58
2.10.4.8. Oxidación por peroxidasas	60
2.10.4.9. Oxidación por antioxidantes de bajo peso molecular	60
2.10.4.10. Daño directo al DNA.....	61
2.11. Compuestos fenólicos	62
2.11.1 Compuesto fenólicos simples.....	63
2.11.2. Ácidos fenólicos y aldehídos	64
2.11.3. Acetofenonas y ácido fenilacéticos	64
2.11.4. Ácidos cinámicos.....	64
2.11.5. Cumarinas	65
2.11.6. Flavonoides	67
2.12. Medición de la cantidad de compuestos fenólicos	70
2.12.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu.....	71
2.12.2. Ensayo de flavonoides totales.....	72



2.12.3. Ensayo de la vainillina	72
2.13 Medición de la capacidad antioxidante.....	72
2.13.1. Ensayos asociados con la transferencia de electrones y radicales.....	73
2.13.1.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	73
2.13.1.2. Ensayo del 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS).....	74
2.13.1.3. Ensayo del Poder Antioxidante/Reductor de hierro (FRAP)	75
3. JUSTIFICACIÓN	77
4. OBJETIVOS.....	80
4.1 Objetivos generales.....	80
4.2 Objetivos particulares	80
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	81
5.1 Métodos generales de análisis	81
5.1.1. Análisis cromatográficos.....	81
5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas	81
5.2 Material vegetal	82
5.3 Tratamiento previo del material vegetal	82
5.4. Estudio fitoquímico del fruto de <i>Crataegus mexicana</i> (tejocote).....	82
5.4.1. Obtención del extracto metanólico.	82
5.4.2. Fraccionamiento primario del extracto metanólico.	82
5.4.3. Fraccionamiento secundario del extracto metanólico.....	83
5.4.4. Obtención e identificación de los flavonoides (-)-epicatequina, kaempferol y quercetina..	84
5.5. Determinación del contenido de antioxidantes.	86
5.5.1. Determinación de fenoles totales.	86
5.5.2. Determinación de flavonoides totales.....	86
5.6. Ensayos de capacidad antioxidante.	87
5.6.1. Determinación de la actividad inhibitoria del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·).	87



5.6.2. Determinación de la actividad inhibidora del radical 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).....	87
5.6.3. Determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP).....	88
6. RESULTADOS.....	89
6.1. Determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales	89
6.1.1. Determinación de flavonoides totales.....	89
6.1.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	89
6.2 Ensayos de capacidad antioxidante	91
6.2.1 Ensayo de la actividad inhibitoria del DPPH.....	91
6.2.2 Ensayo de la actividad inhibidora del radical ABTS ^{•+}	91
6.2.3 Ensayo de la capacidad reductora de hierro (FRAP).....	92
6.3. Caracterización de los flavonoides.....	94
7. DISCUSION DE RESULTADOS.....	95
7.1. Determinación del contenido de antioxidantes.....	95
7.1.1 Determinación de flavonoides totales.....	95
7.1.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.....	96
7.2 Determinación de la capacidad antioxidante	98
7.2.1 Ensayo del DPPH.....	100
7.2.2 Ensayo del ABTS	101
7.2.3 Poder antioxidante/reductor de Fe ³⁺ (FRAP)	103
7.3 Identificación de los flavonoides aislados a partir de los frutos del tejocote.....	104
8. RESUMEN Y CONCLUSIONES	104
9. PERSPECTIVAS.....	106
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

**Lista de Cuadros**

Cuadro 1. Categoría taxonómica de <i>Crataegus mexicana</i> (Hernández, 2008).	4
Cuadro 2. Especies del género <i>Crataegus</i> que se emplean en el tratamiento de la hipertensión arterial sistemática y en otros padecimientos.	12
Cuadro 3. Estructura química de algunos flavonoides presentes en el género <i>Crataegus</i> (Zhang, 2001; Chang, 2002; Hernández, 2008;).	17
Cuadro 4. Ejemplo de algunos compuestos fenólicos (Vermerris <i>et al.</i> , 2006).	66
Cuadro 5. Clasificación y estructura general de algunos flavonoides (Pérez <i>et al.</i> , 2001).	68
Cuadro 6. Determinación de cantidad de flavonoides y fenoles totales.	90
Cuadro 7. Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico y la quercetina para los ensayos DPPH, ABTS y FRAP).	93
Cuadro 8. Estructuras de flavonoides purificados y caracterizados presentes en el fruto de tejocote.	94

Lista de diagramas

Diagrama 1. Proceso de la obtención y fraccionamiento del extracto metanólico del fruto del tejocote del género <i>Crataegus mexicana</i>	85
--	----

**Lista de figuras**

Figura 1. Ilustración de <i>Crataegus mexicana</i> (Rzedowski <i>et al.</i> , 2005).....	9
Figura 2. Distribución estimada de <i>C. mexicana</i> Moc Sessé y <i>C. gracilior</i> Phipps en México (Nuñez <i>et al.</i> , 2009).....	10
Figura 3. Generación de diferentes ROS por energía de transferencia o reducción secuencial univalente del estado basal del oxígeno triplete (Apel <i>et al.</i> , 2004).	26
Figura 4. Reacción catalizada por la SOD (Nacher <i>et al.</i> , 2007).....	29
Figura 5. Descomposición del peróxido de hidrógeno en especies neutras (Nacher <i>et al.</i> , 2007).....	29
Figura 6. Descomposición del peróxido de hidrógeno por el glutatión en conjunto con la glutatión peroxidasa (Reproducido de González <i>et al.</i> , 2000)	30
Figura 7. Regeneración del glutatión oxidado (GSSG) que será reconstituido por la acción del glutatión tripéptido y NADPH (Modificado de Iglesias <i>et al.</i> , 2009).	30
Figura 8. Serie de reacciones en la formación de ROS, donde se involucra la reacción de Fenton (Ferrer <i>et al.</i> , 1999)	30
Figura 9. Estabilización del radical libre por el ácido ascórbico.....	32
Figura 10. Regeneración del radical tocoferilo por la ubiquinona (Ferre <i>et al.</i> , 1999).	32
Figura 11. Reacción del radical peroxilo con la molécula de β -caroteno para formar el aducto correspondiente (Ferrer <i>et al.</i> , 2009).	33



Lista de figuras (continuación).

Figura 12. Búsqueda de especies reactivas de oxígeno (R•) por flavonoides. (Pietta, 2000)	38
Figura 13. Sitios de enlace para trazas de metales (Pietta, 2000)	44
Figura 14. Actividad prooxidante de los flavonoides (Amic <i>et al.</i> , 2007).....	58
Figura 15. Ruta propuesta para la generación del complejo Fe (II)-flavonoide a partir del complejo Fe (III)-flavonoide (Amic <i>et al.</i> , 2007)	62
Figura 16. Estructura básica de los flavonoides. (Modificado de Vermerris, 2006)	68
Figura 17. Reacción en el ensayo de Folin-Ciocalteu	72
Figura 18. Reacción de identificación de flavonoides por medio de vainillina sulfúrica. (Modificado de Martínez, <i>et al.</i> , 2007)	73
Figura 19. Reacción entre DPPH• y la molécula antioxidante (Moon <i>et al.</i> , 2009)	74
Figura 20. Formación del radical catiónico de ABTS ^{•+} con persulfato de sodio (Moon <i>et al.</i> , 2009)	75
Figura 21. Formación del complejo (Fe ²⁺ -TPTZ) a partir de (Fe ³⁺ -TPTZ).....	76
Figura 22. Curva patrón de quercetina para la determinación de flavonoides totales en las muestras de prueba. 2009)	89
Figura 23. (a) Curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales en las muestras de prueba. (b) Coloraciones en la determinación de fenoles totales.	90

**Lista de figuras (continuación).**

- Figura 24. (a)** Curva patrón de Trolox® para el ensayo de DPPH·. **(b)** coloraciones obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto. 91
- Figura 25. (a)** Curva patrón de Trolox® para el ensayo de ABTS^{•+}, **(b)** coloraciones obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto.. 92
- Figura 26.** Curva patrón de ácido ascórbico para el ensayo de FRAP..... 92
- Figura 27. (a)** Curva patrón de Trolox® para el ensayo de FRAP, **(b)** coloraciones obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto. 93
- Figura 28.** Estabilización del aroxi-radical en el anillo B de los flavonoides.
(Reproducido de Kurihara *et al.*, 1999)..... 100
- Figura 29.** Oxidación potencial de productos del catecol 101
- Figura 30.** Generación de estructuras quinónicas después de la oxidación de los flavonoides (Modificado de Guo *et al.*, 2003) 102

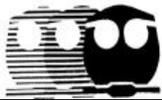


Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
ABTS	2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio
ABTS ^{•+}	Radical 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio
AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
AG	Ácido gálico
AscH	Ácido ascórbico
Asc [•]	Ácido deshidroascórbico
BHA	<i>ter</i> -butilhidroxianisol
BHT	<i>ter</i> -butilhidroxitolueno
C.	<i>Crataegus</i>
CAT	Catalasa
Ccf	cromatografía en capa fina
CH ₃ OH-d ₄ .	Metanol deuterado
Cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenasa
Cu	Cobre
Cu (I)	Cobre con valencia 1
Cu (II)	Cobre con valencia 2
Cu ⁺	Ion cobre (I)
Cu ²⁺	Ion cobre (II)
e ⁻	Electrón
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ELISA	Ensayo enzimático inmunosorbente
ESR	Resonancia de spin electrónico
EpRE	Elemento de respuesta electrofílico
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
GPx	Glutación peroxidasa
FeCl ₃	Tricloruro de hierro
Fe ²⁺ -TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazina ferroso
Fe ³⁺ -TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazina férrico
Fl	Flavonoide
FLA2	Fosfolipasa 2
FIO [•]	Radical flavonoide
FRAP	Capacidad reductora de Hierro
G	Gramos
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación tripéptido

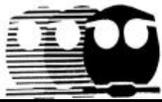
**Lista de abreviaturas (continuación)**

GSSP	Glutación oxidado
GSP	Glutación peroxidasa
GST	Glutación S-Transferasa
H ⁺	Protón
HAT	Átomo de hidrógeno de tranferencia
HCOOH	Ácido fórmico
HCl	Ácido clorhídrico
HO ⁻	Anión hidroxilo
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HO ₂ [·]	Radical perhidroxilo
H ₂ O	Agua
H ₃ CCOOH	Ácido acético
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
Kg	Kilogramo
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potasio
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOO ⁻	Radical peroxilo
LOOH	Peróxido lipídico
LOX	Lipoxigenasa
M	Metro
MHz	Mega Hertz
Mg	Miligramo
mg AA/g	mg equivalentes de ácido ascórbico por cada gramo de extracto
mg AG/100 g	mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto
mg Q/100 g	mg equivalentes de quercetina por cada 100 gramos de extracto
mg TEAC/g	mg equivalentes a capacidad antioxidante de Trolox® por cada gramo de extracto
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μs	Microsegundo
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
Mn	Manganeso
Mo ₃ O ₂₃	Óxido de molibdeno
MPO	Mieloperoxidasa
Nm	Nanómetro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio



Lista de abreviaturas (continuación)

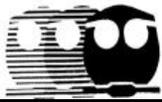
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
Na ₂ MO ₄	Molibdato sódico
Na ₂ WO ₄	Tungstato sódico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
O [·]	Ion oxeno
O ²⁻	Ion óxido
O ₂ ^{·-}	Ion radical superóxido
O ₂ ²⁻	Ion peróxido
¹ O ₂	Oxígeno singulete
³ O ₂	Oxígeno triplete
⁻ OH	Ion hidroxilo
·OH	Radical hidroxilo
QH	Ubiquinona
Q [·]	Radical ubiquinona
R	Coefficiente de correlación lineal
ROS	Especies reactivas oxidantes
RMN ¹ -H	resonancia magnética nuclear protónica
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-Cu	Superóxido dismutasa dependiente de cobre
SOD-Mn	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso mitocondrial
SOD-Zn	Superóxido dismutasa dependiente de zinc
TBHQ	<i>ter</i> -butilhidroxiquinona
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox®
TO [·]	Radical tocoferilo
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazina
Zn	Zinc



1. INTRODUCCIÓN

El género de nombre *Crataegus*, proviene del griego de la palabra “kratos” que significa tan duro como la madera (Verma *et al.*, 2007). *Crataegus* comprende un grupo complejo de árboles y arbustos, nativos en zonas templadas del norte de América (incluyendo México), se encuentra principalmente en latitudes a 30° y 50° N. En general, no son árboles grandes o bien, son arbustos que utilizan como cercas para delimitar en los terrenos o casas, que principalmente se pueden hallar en bosques. (Robertson, 1974; Huang *et al.*, 2004; Donmez, 2004).

Crataegus mexicana mejor conocido como tejocote, es un fruto del árbol del mismo nombre, perteneciente a la familia de las rosáceas, nativo de México, (Nuñez *et al.*, 2008). Desde la época prehispánica, los frutos del tejocote fueron colectados para el consumo y sembrados en huertas de los pueblos indígenas, posteriormente fueron colectados con fines comerciales. Los frutos de las especies de *Crataegus* son utilizados en las celebraciones tradicionales de Todos los Santos y Navidad, principalmente en la elaboración de bebidas (ponche) y consumo en fresco (dentro de las piñatas). El tejocote, por lo tanto, es una parte importante de la cultura tradicional mexicana (Nuñez *et al.* 2009). Hasta el siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural relata el uso del tejocote como diurético y pectoral. A partir del siglo XX, varios autores e instituciones reportan sus usos medicinales. En México se emplea para el tratamiento de afecciones digestivas, renales, cardíacas y del tracto respiratorio (Argueta *et al.* 1994), como diurético (Cabrera, 1982), antidiabético (Cedillo, 1990; González, 1981; Martínez, 1980), incluso para adelgazar (Argueta *et al.* 1994). La droga consiste en la parte



externa y protectora de la raíz, flor, hojas y fruto (Hernández, 2008). En la literatura disponible existen pocos reportes de estudios fitoquímicos de *C. mexicana*.

Gracias a éstos se sabe que en raíz, hojas flores y frutos se encuentran resinas, ceras, taninos, flavonoides, ácidos orgánicos, reductores, principios peptídicos, glúcidos y azúcares. Estudios realizados con los extractos alcohólicos de las hojas, flores, frutos, corteza y raíz, describen la acción cardiotónica sobre corazón aislado de tortuga, la cual consistió en la disminución de la frecuencia y la ampliación de las contracciones cardíacas, identificando la sustancia activa como crategina (Breton, 1941; Verma *et al.*, 2007). Además, los extractos hidroalcohólicos tanto de las raíces como el de las hojas presentaron inhibición de la ECA.

Se estima que hay aproximadamente 280 especies diferentes en el mundo. La selección de la especie para el fruto en estudio, se realizó considerando que es una con los frutos más comercializados en México con fines aperitivos y curativos, tanto en centros de acopio de hierbas curativas como en mercados, tianguis y otros expendios de drogas crudas y productos herbolarios terminados.



2. ANTECEDENTES

2.1. Nombres comunes

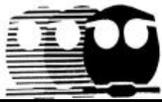
Crataegus mexicana es una especie nativa de México y es conocida con diferentes nombres comunes, por ejemplo en Chiapas se le llama “*Kanal chiste*”, manzanilla, manzanito, manzanillo, tejocote cimarrón (Argueta *et al.* 1994); en el Distrito Federal se le conocía como “*texócotl*” del náhuatl que significa “tetl” piedra y “xocotl” que significa fruto ácido, por lo tanto el significado es “fruto ácido de piedra” (CONABIO, 2011); en el Estado de México “*npeni*” (otomí) (Argueta *et al.* 1994), “*pedyi*” (lengua mazahua); en Michoacán “*karhasi*”, “*karasa*”, “*karash*”, “*karasu*” (purépecha) (Rzedowski *et al.* 2005), “*caiasa*”, “*carasu*” (lengua tarasca), manzanilla, manzanita; en Oaxaca: “pelo-uij”, “*yaga-be-lohui*” (lengua zapoteca), “el pate-shima-lo” (lengua chontal) (CONAFOR 2011), manzanita tejocotera, hierba del tejocote, texcocotl (Márquez, 1999).

2.1.1. Sinonimia botánica

Crataegus mexicana Moc. Sessé, *Crataegus stipulosa* (Kunth) Steudel.

2.2. Categoría taxonómica de *Crataegus mexicana*

La categoría taxonómica de *C. mexicana* se muestra en el **Cuadro1**.

**Cuadro 1.** Categoría taxonómica de *Crataegus mexicana* (Hernández, 2008).

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Subdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Maloideae
Género:	<i>Crataegus</i>
Especie:	<i>Crataegus mexicana</i>

2.3. Descripción

2.3.1. Descripción macroscópica de *Crataegus mexicana*

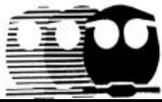
Crataegus mexicana, crece en un árbol de 4 a 7 m (incluso hasta 10 m) de alto y que en ocasiones son arbustos, de hoja decidua, por lo común provisto de espinas que a menudo son muy fuertes, hasta 5 (6) cm de largo, en ocasiones parcial o totalmente inerme; tronco hasta de 30 cm de diámetro, ramas café-rojizas, con el tiempo se vuelven grisáceas, las más jóvenes son densamente vilosas, estípulas lanceoladas o blanceoladas, hasta de 1.2 cm de largo y 2 mm de ancho, a veces falcadas o semiovadas y algo más cortas y anchas, con glándulas cortamente estipitadas en el margen, caedizas, peciolos de 5 a 10 mm de largo, más o menos



canaliculados en el haz, láminas foliares amplia o estrechamente elípticas a lanceoladas blanceoladas, a veces tendiendo a rómbicas, de 3(2.5) a 7.5(9) cm de largo por 1.5(1) a 4(5) cm de ancho, ápice agudo o a veces obtuso a casi redondeado, en ocasiones apiculado, base por lo general cuneada, margen comúnmente serrado hacia la parte superior con dientes grandulíferos y entero hacia el medio o tercio inferior, en las hojas de ramas jóvenes a veces tendiendo a algo lobado (WHO, 2003; Huang *et al.*, 2004; Rzedowski *et al.*, 2005).

Tiene hojas con láminas romboideo-elípticas a ovadas u oblongas a ovadas, de 3 a 11 cm de largo, por 1 a 5 cm de ancho (Gutiérrez, 1991), con el borde aserrado (Cedillo, 1990), vena media hundida en el haz, prominente en el envés, con 6 a 8 pares de venas laterales evidentes, de textura algo coriácea en la madurez, de color más oscuro en el haz, densamente vilosas por ambas caras, en especial en la juventud en el envés y sobre las nervaduras, pero con tendencia a la glabrescencia con la edad, a veces quedando prácticamente lampiñas con excepción de las nervaduras (Rzedowski *et al.*, 2005).

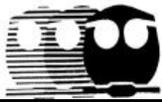
Inflorescencia corimbioforme, densamente blanco-vilosa compuesta de 4(3) a 10(12) flores, con frecuencia acompañadas de varias o numerosas brácteas provistas en el margen de glándulas cortamente estipitadas; flores de 1.5 a 2 cm de diámetro; hipantio blanco viloso por fuera, los segmentos del cáliz estrechamente triangulares, de 5 a 7 (8) mm de largo, terminados en punta u ocasionalmente con 2(4) dientes glandulosos en el ápice, de margen por lo general entero, pero en algunos casos con varias glándulas cortamente estipidas, por lo común densamente vilosos por fuera y por dentro, excepcionalmente



glabros por fuera; pétalos blancos, a veces algo teñidos con color rosa, suborbiculares, cortamente unguiculados, de 8 a 10 mm de largo y casi otro tanto de ancho; estambres alrededor de 20, dispuesto en 2 verticilos de longitud algo desigual, anteras oblongas, de 1 a 1.5 (1.7) mm de largo; estilos 2(2) a 5, de los cuales 1 ó 2 pueden estar mal desarrollados (Rzedowski *et al.*, 2005), corola y androceo en el borde del cáliz; el gineceo ínfero constituido por 5 carpelos unidos al eje floral: en cada división del ovario hay dos óvulos ascendentes (Owen, 1932). El fruto es amarillo-anaranjado, globoso o algo turbinado (Rzedowski *et al.*, 2005), carnoso y seco (Márquez, 1999) de 1.5(1.2) a 2.5(4) cm de diámetros, con frecuencia más o menos viloso, sobre todo en la juventud; lóbulos del cáliz persistentes, núculas 3(1) a 5, lisas, de color café, a menudo trígonas, de 6 a 10 mm de largo (Rzedowski *et al.*, 2005). Usualmente tiene 3 ó 4 semillas, muy duras, de 1 cm de largo, cafés, lisas, con tres costillas (Gutiérrez, 1991), ellas contienen un embrión voluminoso desprovisto de endospermio (Owen, 1932; WHO, 2003; Huang *et al.*, 2004).

2.3.2. Descripción microscópica de *Crataegus mexicana*

La madera presenta porosidad difusa, la mayoría de los poros son solitarios y pocos son múltiples radiales de 2, son muy numerosos, de contorno oval, de diámetro tangencial pequeño. Los elementos de vaso son medianos, sus paredes presentan punteaduras aeroladas alternas, redondas a ovales, la platina de perforación es simple y la pared terminal es oblicua. Algunos presentan gomas. El parénquima axial es apotraqueal difuso agregado. Los radios son pocos,



uniseriados, de 8 células de altura y la mayoría son biseriados, numerosos, heterogéneos, muy bajos y finos. Las punteaduras de radio-vaso son semejantes a las intervasculares. Ambos parénquimas presentan gomas y el radial presenta cristales prismáticos. Las fibras son de tipo fibrotraqueida, de longitud corta, de diámetro fino y de pared delgada (Pérez *et al.*, 2008).

2.4. Origen del género *Crataegus*

Existen aproximadamente 280 especies del género *Crataegus*, las cuales tienen su origen en China y México. Son cultivadas en Asia, Australia, Canadá, México, América Central y Ecuador (Vivar *et al.*, 2005). Se distribuye en todo el mundo, pero principalmente en el hemisferio norte del planeta (Nieto *et al.*, 2009). El género *Crataegus* es el más amplio y taxonómicamente complejo de los géneros de plantas superiores en Estados Unidos de América, se han reportado 13 especies en el norte y centro de México y dos o más especies pueden existir en el sur de México. Phipps y sus colaboradores (2003) reportaron que las especies mexicanas pertenecen a seis diferentes series taxonómicas (*baroussanae*, *greggiana*, *pervifoliae*, *madrenses*, *cruz-galli* y *mexicanae*), pero se desconoce la ubicación de la más amplia biodiversidad de *Crataegus* en México (Nuñez, 2009).

Adicionalmente, la identificación de estos ejemplares de este género es problemática, se cometen errores al identificar ejemplares de tejocote como *C. Pubescens* (Kunth) Steud que es un nombre incorrecto desde 1997, siendo correctamente referido como *C. gracillior* Phipps (1997), para ciertos especímenes; además, que a partir del trabajo de Eggleston (1909) es conocido *C. mexicana* DC



y *C. pubescens* (*C. gracillior*) son dos especies diferentes, lo que fue desapercibido por los taxónomos mexicanos hasta la reclasificación de Phipps (1997), esto fue ampliamente discutido por Nuñez (2008) quien cuestionó la validez de nombres específicos como *C. estipulosa* (Kunth) Steud para especímenes identificados en el sur de México. El nombre común que se da en México para especies del género *Crataegus* es “tejocote” (Nuñez, 2009).

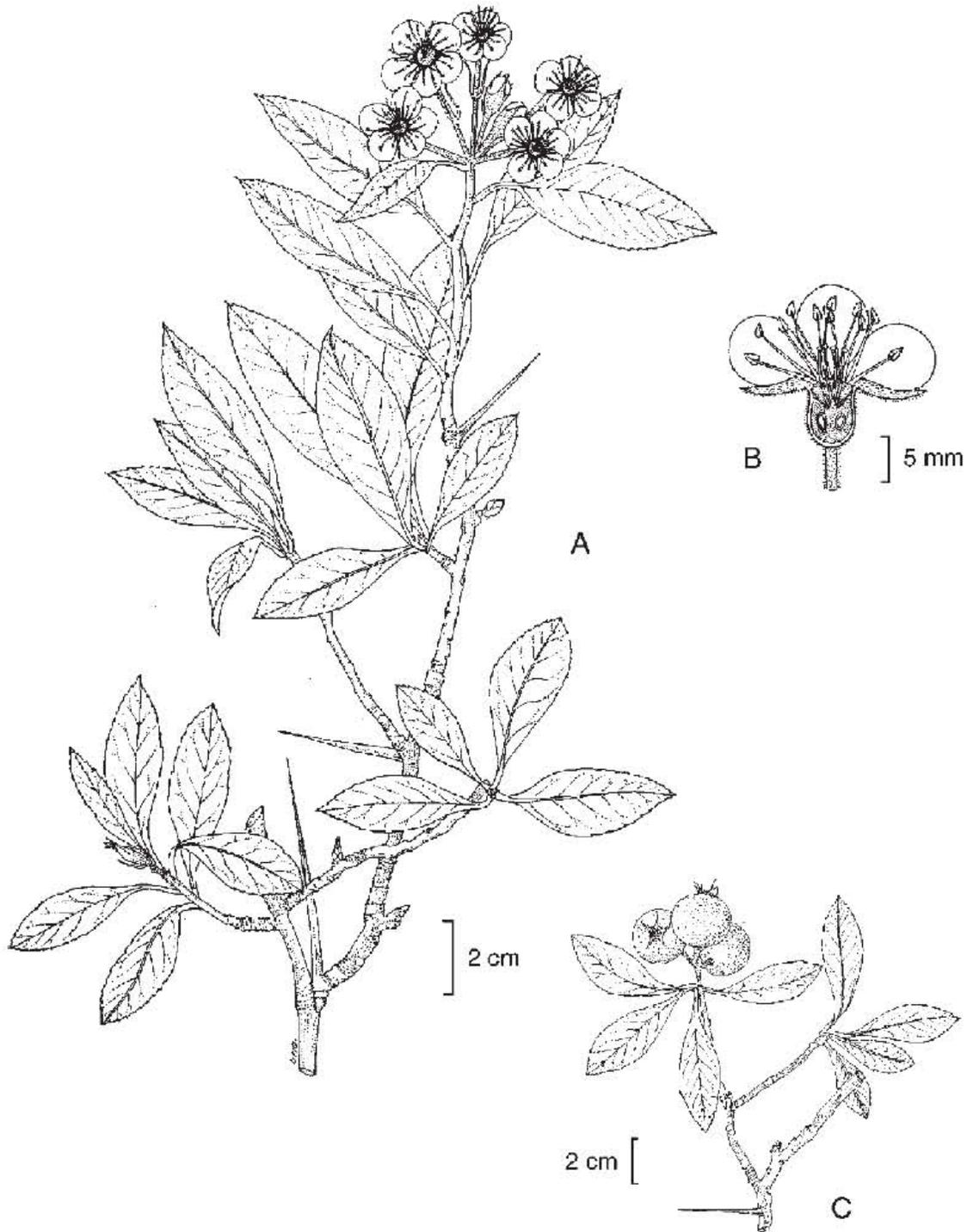
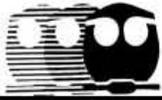
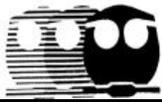


Figura 1. *Crataegus mexicana*. A. Rama con hojas, flores y espinas; B. Corte longitudinal de la flor; C. Rama con frutos. Ilustrado por Miguel Carmona, excepto el dibujo B, que fue realizado por Rogelio Cárdenas (Rzedowski *et al.*, 2005).



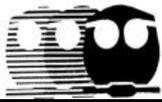
2.5. Distribución geográfica de *Crataegus mexicana*

De acuerdo a Morrone (2005), en México, la ubicación del tejocote se distribuye en una zona denominada como la región biogeográfica del Eje Volcánico Transmexicano. La principal zona de distribución es el Eje Neo-Volcánico desde las zonas altas de Veracruz en frontera con Puebla hasta las zonas montañosas de Jalisco muy cerca de la costa del Océano Pacífico, así como algunos puntos en la Sierra Madre Oriental a la altura de la sierra de Hidalgo y en el sur en la sierra de Oaxaca y unos puntos aislados en Chiapas (Nuñez, 2009).

En este sentido el principal estado productor de tejocote en México es Puebla con alrededor del 80% de la producción nacional (SIAP 2014, Nuñez, 2009); aunque cabe mencionar que en estadísticas oficiales no toman en cuenta producciones de huertos familiares, ni recolección de manera natural.



Figura 2. Distribución estimada de *C. mexicana* Moc Sessé y *C. gracilior* Phipps en México (Nuñez *et al.*,2009).



2.6. Historia de *Crataegus mexicana*

Se sabe que a principios del horizonte preclásico existían pequeños asentamientos en las riveras del lago de Xaltocan que se dedicaban ya a la recolecta de tejocote (Imaz, 1989).

El tejocote también se conoce en Europa en donde se le asigna el nombre de *Crataegus oxyacantha* (Aubépiné) teniéndose datos de sus historia medicinal desde el tiempo de Dioscórides, proporcionados por el señor Enrique Leclerc, en su artículo “L´ aubépiné” (Owen, 1932).

Vicente Cervantes profesor de botánica de la Ciudad de México de 1788 a 1829, también hace referencias al tejocote en su “ensayo a la materia vegetal de México” nombrándolo *Mespilus mexicana* menciona sus propiedades astringentes (Bulletin of Miscellaneous Information, 1933).

Sesse y Mociño quienes explotaron grandes distritos de México entre 1795 y 1804 lo describen en su “Plantae Novae Hispaniae” como *Crataegus crus-galli* o “Texocotl” de los mexicanos. Las describe como “bayas agrdulces, comestibles y principalmente utilizadas para conservas dulces, ya que se produce una gran cantidad de jalea, que preparada con azúcar es preferida por los indios” (Bulletin of Miscellaneous Information, 1933).

Los indígenas mexicanos tomaban infusiones para curar erupciones en la piel, para disminuir la temperatura del cuerpo, particularmente mezclado con capulín (Bulletin of Miscellaneous Information, 1933).

Hasta el siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural relata el uso del tejocote como diurético y pectoral. A partir del siglo XX, varios autores e



instituciones reportan usos medicinales. El Instituto Médico Nacional lo menciona como diurético; Alfonso Herrera como pectoral y diurético eficaz, Maximino Martínez como antitusígeno y diurético, Luis Cabrera como digitálico, diurético y tónico. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México lo señala como afrodisiaco, diurético y pectoral (Argueta *et al.*, 1994).

En 1932 Owen realizó un análisis químico y un estudio farmacológico. Más tarde Breton realizó un estudio similar. En 2009 Hernández realizó una tesis enfocada a la inhibición de la ECA con extracto de *Crataegus mexicana*, en la que logró identificar un compuesto responsable de esta actividad.

Algunas especies de *Crataegus* son descritas en farmacopeas muy antiguas y se emplean como una alternativa para el tratamiento de una variedad de condiciones cardiovasculares, incluyendo angina, hipertensión y arritmias (Hernández, 2008).

Cuadro 2. Especies del género *Crataegus* que se emplean en el tratamiento de la hipertensión arterial sistemática y en otros padecimientos.

Especie	País de uso	Propiedades y usos	Extractos utilizados y/o estudiados
<i>C. aronia</i>	Israel	-ECV -Cáncer -Diabetes -Antioxidante	Extracto acuoso de hojas y frutos.
<i>C. tanacetifolia</i>	Alemania Turquia	-Insuficiencia cardiaca. -Reductor de los niveles de colesterol.	Extracto acuoso de hojas.
<i>C. laevigata</i>	Alemania	-Insuficiencia cardiaca severa.	Extracto metanólico de hojas, flores y frutos.



Cuadro 2 (continuación). Especies del género *Crataegus* que se emplean en el tratamiento de la hipertensión arterial sistemática y en otros padecimientos.

<i>C. oxycantha</i>	Alemania Suiza China	-Insuficiencia cardiaca. -Antioxidante. -Anti-inflamatorio. -Digestivo. -Estimulante cardiaco -Hipotensivo. -Arrítmico. -Diurético. -Antihipertensivo.	Extracto etanólico de hojas y frutos.
<i>C. monogyna</i>	Lituania	-Antioxidante. -ECV. -Cardiotónico. -Vasodilatador. -Hipotensivo.	Extracto etanólico de hojas, flores y frutos.

2.7. Usos de *Crataegus mexicana*

2.7.1. Etnobotánica

Crataegus mexicana tiene múltiples usos descritos en la medicina tradicional mexicana, no sustentados en información experimental o clínica, por ejemplo contra la diarrea, como diurético, para malestares gastrointestinales, para tratar la tos, la congestión de pecho y para padecimientos del corazón, además para adelgazar.

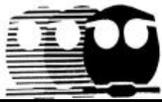
1. Afecciones digestivas: Para detener la diarrea (Gutiérrez, 1991; Argueta *et al.*, 1994). Para enfermedades del aparato digestivo como diarrea, amibas y en caso de disentería (la que se considera muy peligrosa. Acompañada de dolores estomacales y vómito) esta enfermedad es denominada popularmente “chi’ ich” (Chiapas). Dolor de abdomen o lombrices (oxiuros) (Argueta *et al.*, 1994; Benli *et al.*; 2008; Tadic *et al.*, 2008).



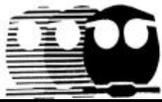
2. Afecciones del tracto respiratorio: Para la tos (Gutiérrez, 1991; Linares, 1991; Argueta *et al.*, 1994). Para la pulmonía y el asma (Argueta *et a.*, 1994).
3. Diurético (Cabrera, 1982).
4. Para los riñones (Gutiérrez, 1991).
5. Antidiabético (Martínez, 1980; González, 1981; Cedillo, 1990).
6. Para la “*kuenesi*” o chipilez (afección exclusiva de la etapa infantil que se presenta cuando la madre se encuentra nuevamente preñada, se caracteriza por llanto continuo de los niños que están irritables, se adelgazan, su piel se torna amarilla y no comen) (Argueta *et al.*, 1994).
7. Para la hidropesía, como aperitivo y desobstruyente (Cabrera, 1982).

2.7.1.1. Formas de dosificación a nivel popular

Para detener la diarrea, se usan dos tejocotes, un pedazo de canela y pasitas, todo en té (Gutiérrez, 1991). Otra forma es utilizar la cocción de las hojas y corteza, administrada por vía oral, además de que sirve para dolor de estómago y en corajes (Argueta *et al.*, 1994). Para el dolor de abdomen o lombrices (oxiuros), se da el té de “manzanilla” con otras yerbas, acompañado de rezos (Argueta *et al.*, 1994). Para uso como diurético se toman las hojas de infusión, en la porción de 10 g de hoja para 100 mL de agua, 3 veces al día, antes del desayuno, la comida y la cena. Si se utiliza la raíz, esta acción es más marcada, por esta razón es empleada en las inflamaciones renales y más cuando hay anasarca, es decir cuando los enfermos presentan una hinchazón generalizada en todo el cuerpo, ya sea de origen renal propiamente dicho o cuando tal estado se debe a falta de



energía al corazón, al parecer esto también obra reforzando y tonificando el centro circulatorio. Parece que los frutos aumentan en forma notable la energía muscular (Cabrera, 1982). Para afecciones renales la raíz se hierva con varias gotas de limón, y se toma diario durante ocho días hasta que se quite el dolor (Gutiérrez, 1991). También se prepara un té con dos frutos, 1 pedazo de raíz y canela en medio litro de agua, se toma una taza en la mañana y una taza por la tarde (Linares, 1991). Otra forma de preparación, es cocer el tejocote con flor de sauco (*Sambucus mexicana*), ítamo real (*Arracacia aegopodioides*), cáscara de chirimoya (*Annona cherimola*), cáscara de lima (*Citrus limetta*) y ocote (*Pinus sp.*) o simplemente con canela (Argueta *et al.*, 1994). Para la pulmonía y asma, se aprovecha el cocimiento acompañado con eucalipto (*Eucalyptus globulus*), flor de bugambilia (*Bougainvillea spectabilis*), corteza de capulín (*Prunus serótina* spp. capulí), sauco, flor de obelisco y gordolobo, se toma el té antes de cada comida (Argueta *et al.*, 1994). Para el uso como antidiabético, se hace una cocción con la raíz, raíz de nopal y raíz de zarzamora (un pedazo pequeño para 1 L de agua), se toma tres veces al día como agua de uso (Cedillo, 1990). Otra forma es tomar la infusión de la raíz con la planta *istactziotzo* (*Piqueria trinervia cav.*) (González, 1981). También se pueden cocer 15 g de raíz y 5 g de corteza del tallo en 2 L de agua. Dejando hervir hasta que se reduzca a la mitad y se toman 2 a 3 tazas durante todo el día (Martínez, 1980). Para la hidropesía, como aperitivo y como desobstruyente, se cuece la raíz. En casos de calentura se toman baños de la planta con leche y jabón “Palmolive” (SEMARNAT, 2014).



2.7.2. Usos no medicinales

Se considera como una especie ¹melífera. La madera es muy dura y compacta, se utiliza como leña y para la elaboración de mangos de herramienta. Los frutos son comestibles, se comen crudos o se preparan en dulces y mermeladas. Una de las características del fruto es su alto contenido de pectina, misma que se utiliza en la industria farmacéutica, textil y siderúrgica, para la elaboración de cosméticos y como coagulante de mermeladas y jaleas; también se utiliza como forraje para cerdos, borregos, conejos y chivos. La flor es utilizada en la producción de miel (CONAFOR, 2014).

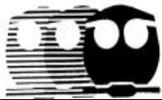
Se utiliza en la conservación de suelo y control de la erosión, para reforestar taludes y barrancas en zonas semiáridas, es utilizada como sombra, y refugio de fauna. Su resistencia a enfermedades y su resistencia a condiciones adversas son características importantes para considerarlo en plantaciones de restauración de sitios degradados (CONAFOR, 2014).

Además es utilizado como patrón de semilla para injertar manzano, peral y membrillo (CONAFOR, 2014).

2.8. Composición química del fruto del género de *Crataegus*

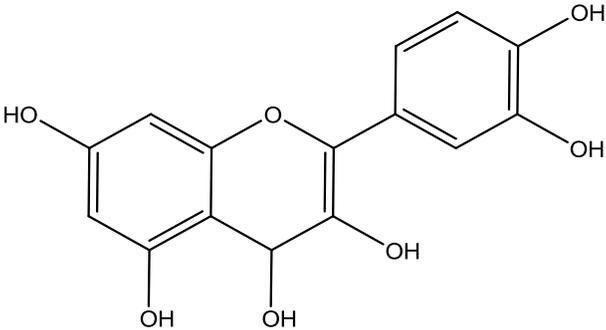
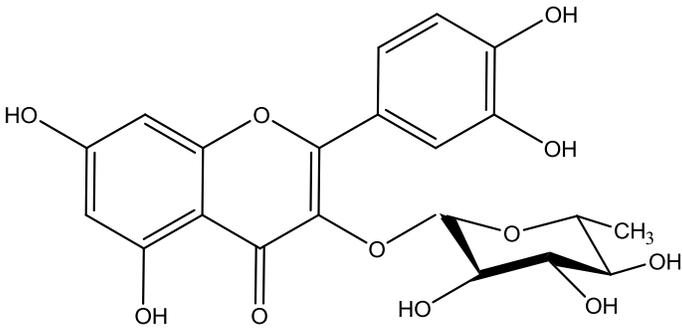
En la literatura disponible hasta el momento, existen hasta el momento, existen escasos estudios fitoquímicos de *C. mexicana*; sin embargo, en los frutos de otras especies medicinales de *Crataegus* se han encontrado concentraciones altas de diversos metabolitos secundarios tales como flavonoides, procianidinas oligoméricas de flavanoles, ácidos fenólicos, ácidos triterpénicos, ácidos orgánicos

¹Melífera. Relativo a la miel



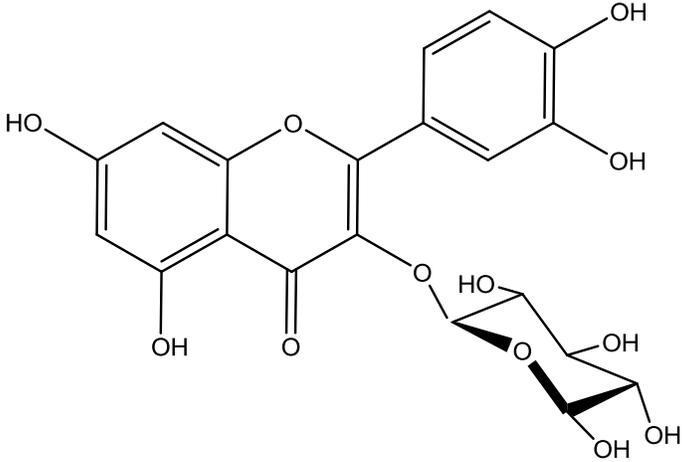
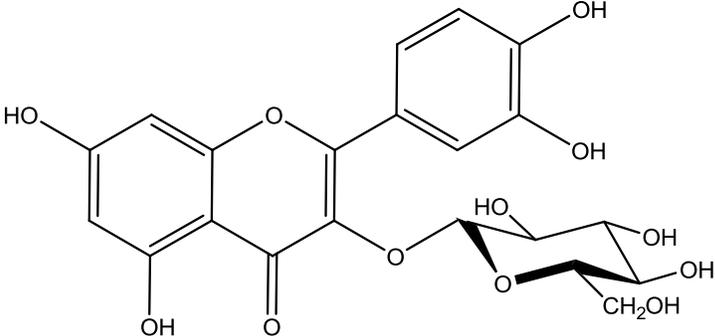
y esteroides, así como (-)-epicatequina y catequina (Verma *et al.*, 2007; Hernández, 2008). También contienen una cantidad importante de pectinas, resinas y taninos (Argueta *et al.*, 1994). Además se ha encontrado que los frutos y flores del género *Crataegus* presentan constituyentes con potencialidad antioxidante, entre ellos los ácidos de epicatequina y 5-clorogénico. Por otro parte el fruto también es rico en vitamina C, carotenos y sales minerales, entre ellas calcio, fósforo, hierro y presenta un alto contenido de pectina (Franco *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Estructura química de algunos flavonoides presentes en el género *Crataegus* (Zhang, 2001; Chang, 2002; Hernández, 2008).

Estructura	Tipo	Nombre
	Flavonoide	Quercetina
	Flavonoide	Quercitrina

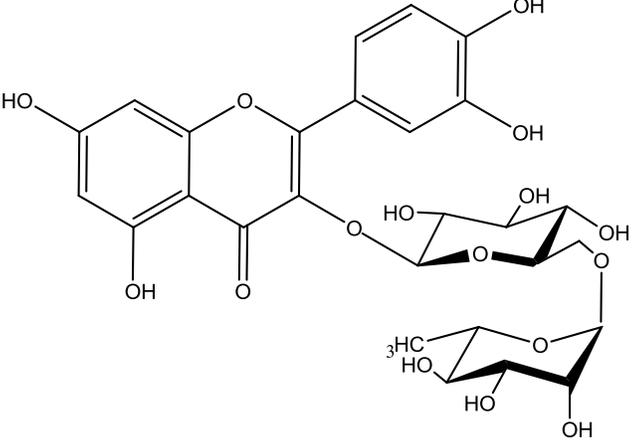
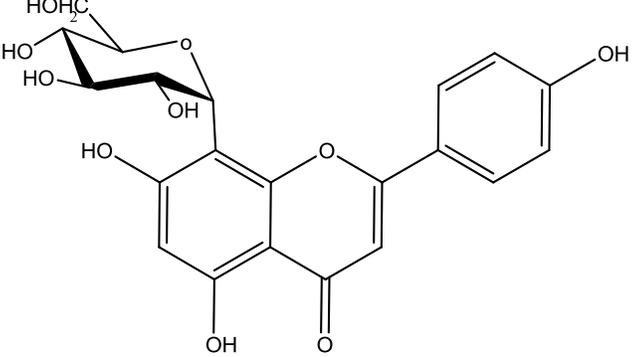
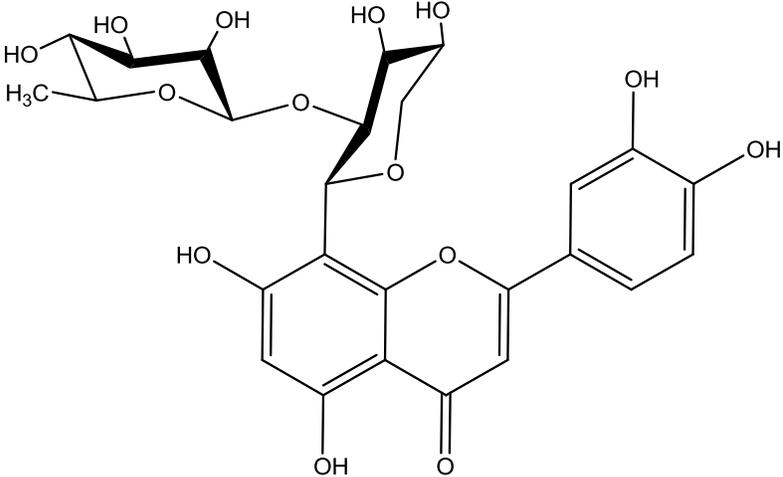


Cuadro 3. Estructura química de algunos flavonoides presentes en el género *Crataegus* (Zhang, 2001; Chang, 2002; Hernández, 2008).

Estructura	Tipo	Nombre
	Flavonoide	Isoquercitrina
	Flavonoide	Hiperósido

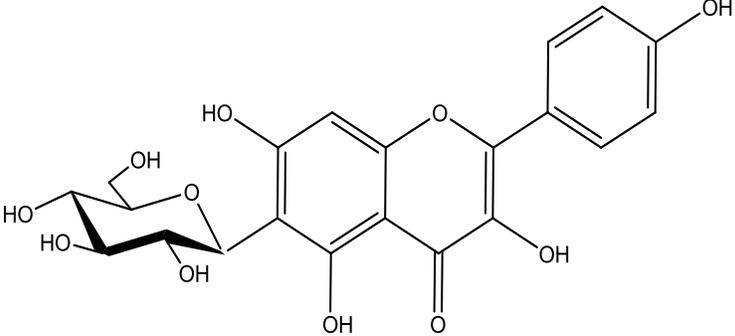
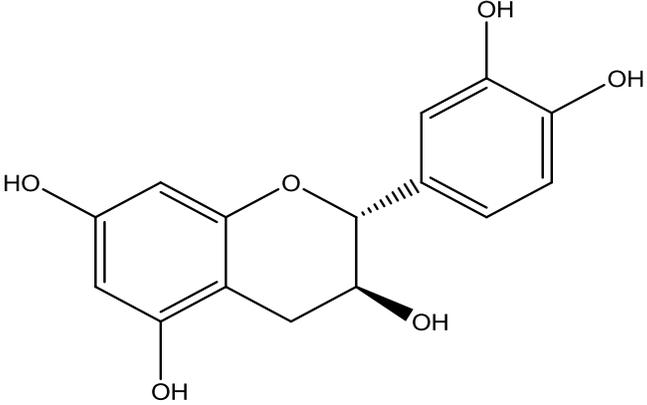
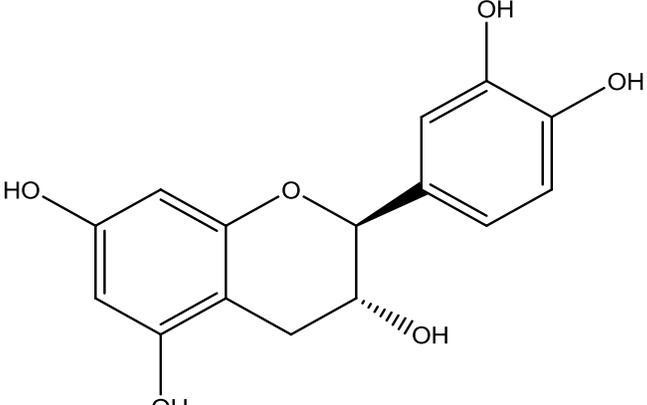


Cuadro 3. Estructura química de algunos flavonoides presentes en el género *Crataegus* (Zhang, 2001; Chang, 2002; Hernández, 2008).

Estructura	Tipo	Nombre
	Flavonoide	Rutina
	Flavonoide	Vitexina
	Flavonoide	Ramnósido de vitexina



Cuadro 3. Estructura química de algunos flavonoides presentes en el género *Crataegus* (Zhang, 2001; Chang, 2002; Hernández, 2008).

Estructura	Tipo	Nombre
	Flavonoide	Isovitexina
	Flavonoide	Catequina
	Flavonoide	(-)- Epicatequina



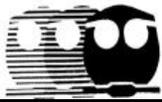
2.9. Farmacología del género *Crataegus*

La mayoría de actividades farmacológicas de las especies de *Crataegus*, son relacionadas principalmente a actividades cardiovasculares, como son cardiotónicas, antiarrítmicas, hipotensivas, hipolipidémicas y como agentes antioxidantes (Garjani *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002; Degenring *et al.*, 2003; Jayalaksmi *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2006; Tadic *et al.*, 2008).

Numerosos estudios en animales y ensayos *in vitro* que se realizaron con extractos solubles en agua y/o alcohol, se aislaron y se usaron fracciones que contenían flavonoides y proantocianidinas oligoméricas, provenientes de frutos, hojas y flores de plantas del género de *Crataegus*, no obstante, estos estudios se realizaron con los extractos realizados de cada parte de la planta antes mencionada y también con los compuestos activos aislados (hiperósido, glucósido 7 de luteolín, epicatequina, vitexina y rutina, principalmente). Se determinó que estos compuestos presentaron acciones cardiotónicas marcadas, pues se observó un efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo, un aumento en el flujo sanguíneo coronario, potencia cardíaca y una reducción en el consumo de oxígeno. (Li *et al.*, 1984; Bohinc, 1987; Popping *et al.*, 1995; Schussler *et al.*, 1995; Kocyildiz *et al.*, 2006).

Estas acciones se relacionan con el efecto inhibitorio de las fosfodiesterasas. (Petkov *et al.*, 1981; Schussler *et al.*, 1995).

Breton en 1941 en su trabajo titulado contribución al estudio botánico, químico y farmacodinámico de *C. mexicana* trabajó con extractos alcohólicos del fruto, hoja, flor, corteza y raíz del tejocote. Encontró que estos extractos ejercieron acción



cardiotónica sobre el corazón aislado de tortuga, disminuyendo la frecuencia cardíaca y la ampliación de las contracciones cardíacas. Obteniendo un mayor efecto con las hojas seguido de la corteza, flores, raíces y fruto. Se encontró una correlación positiva entre la relación dosis-actividad. Esta acción se observó en los extractos más activos, aún a diluciones tan altas como 1:1000,000.

En los extractos derivados de los frutos y hojas con flores de las especies de *Crataegus*, se han encontrado acciones de protección contra arritmias cardíacas inducidas por aconitina, cloruro de calcio y adrenalina-cloroformo en varios experimentos en ratas y ensayos *in vitro* (Costa *et al.*, 1986; Occhiuto *et al.*, 1986; Antsyshkina *et al.*, 1990). Otros estudios describen el efecto de extractos preparados a partir de *Crataegus oxyacantha* y la comparación de su eficacia con otros fármacos cardioprotectores como la ouabaina, la epinefrina, la milrinona y el propranolol. Los resultados obtenidos reportan una potente acción antiarrítmica del extracto, mostrando una actividad similar a los fármacos antes mencionados, pues el extracto fue capaz de inducir ritmicidad en cardiomiocitos y actividad antiarrítmica. Estas preparaciones de extracto de *Crataegus*, también exhibieron una actividad cronotrópica similar, sin embargo también mostró efectos cronotrópicos negativos y no es causado por el bloqueo del receptor β -adrenérgico. (Long *et al.*, 2006).

Los extractos de especies de *Crataegus* ricos en flavonoides y proantocianidinas oligoméricas fueron administrados vía intravenosa a varias especies de animales y se observó que prolongando las dosis dependientes de estos extractos, se generaba un efecto hipotensivo en animales normotensivos anestesiados e

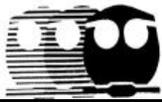


hipertensivos (Rewerski *et al.*, 1967; Occhiuto *et al.*, 1986; Abdul-Ghani *et al.*, 1987; Haslam, 1989; Garjani *et al.*, 2000). La acción hipotensiva fue mayormente atribuida a vasodilatación periférica (Twaij *et al.*, 1987). En más estudios realizados con extractos de *Crataegus*, se encontró una inducción en la relajación dependiente al endotelio en arteria mesentérica aislada de rata. Las procianidinas fueron identificadas como los componentes mayoritarios para este efecto (Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000).

Se ha encontrado una disminución de los niveles séricos de colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL) de colesterol y triglicéridos en animales hipercolesterolémicos y ateroscleróticos, cuando se les administra extractos de frutos y hojas de *Crataegus*. Esto también inhibe de manera significativa la deposición lipídica en hígado y aorta (Li *et al.*, 1988; Shanti *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Shanti *et al.*, 1996). Cuando se administraron extractos de frutos de *Crataegus* en ratas alimentadas con una dieta ¹aterogénica, se observó un aumento en la excreción de ácidos biliares, una disminución de la síntesis de colesterol hepática y un aumento importante de unión de lipoproteínas de baja densidad a membranas plasmáticas en el hígado, indicando que existe un mejoramiento en la actividad de receptor de LDL (Rajendran *et al.*, 1996).

Por otro lado, en algunos estudios *in vitro*, varios extractos de frutas, hojas y flores de *Crataegus*, se han encontrado actividad antioxidante (Bahorun *et al.*, 1996; Bahorun *et al.*, 1994). Estas actividades se relacionan en conjunto con proantocianidinas oligoméricas y flavonoides, o bien, de manera individual, tal como la epicatequina, rutina, hiperósido e isoquercitrina, pues también muestran

¹Aterogénico. Obstrucción potencial de las arterias, tomando en cuenta los ácidos grasos láurico (12 carbonos), mirístico (14 carbonos) y palmítico (16 carbonos) en relación con los ácidos grasos monoinsaturados y polisaturados.



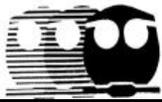
un fuerte efecto inhibitorio contra la oxidación de LDL humana (Zhang *et al.*, 2001). En muchos estudios *in vivo*, se ha encontrado que extractos alcohólicos procedentes de las frutas, hojas y flores de especies de *Crataegus*, producen un efecto protector en el estrés oxidativo en ratas experimentales ateroscleróticas (Shanthi *et al.*, 1996). El extracto previno el aumento de la peroxidación y la disminución del contenido de glutatión y α -tocoferol en hígado, aorta y tejido cardíaco. Esto también normaliza los niveles de enzimas antioxidantes en los órganos antes mencionados y disminuye la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en ratas o ratones hiperlipidémicos (Dai *et al.*, 1987).

2.10. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir hay un desbalance entre los mecanismos oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Cuando las especies reactivas oxidantes superan las defensas antioxidantes se produce el estrés oxidativo y como consecuencia hay daño a las macromoléculas celulares como proteínas, ADN y lípidos. Por ejemplo la lipoperoxidación, conduce a la pérdida de las propiedades de la membrana celular por lo que se asocia como la causa de enfermedades como aterosclerosis y artritis reumatoides (Ríos de Molina, 2003).

2.10.1. Radicales libres y especies reactivas

Los radicales libres son definidos como especies químicas reactivas que tienen un electrón desapareado en uno de sus orbitales. Esta configuración inestable crea



energías que se liberan a través de moléculas adyacentes, como las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. La mayoría de los radicales libres que dañan sistemas biológicos son radicales libres de oxígeno y que son generalmente conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS). Hay muchos bioproductos formados en células de organismos aerobios y que pueden iniciar reacciones autocatalíticas, es decir, con moléculas que reaccionan consigo mismo, generando radicales libres y por consecuencia, propagan un daño en cadena. Las ROS pueden ser generadas durante la irradiación a la luz ultra violeta y por rayos gama o por rayos X, o también pueden ser producidos durante las reacciones de catalización con algunos metales o por aquéllos compuestos que están presentes en la atmósfera como contaminantes. También son producidos por neutrófilos y macrófagos durante el proceso inflamatorio y también por productos de las reacciones de transporte electrónico de la mitocondria y varios otros mecanismos. (Cadenas, 1989).

El estado molecular del oxígeno triplete es un biorradical con dos electrones de valencia más externos, ocupando orbitales separados con spines paralelos. Al oxidar un no-radical, un átomo o una molécula, el oxígeno triplete necesita reaccionar con otro que proporciona un par de electrones con espines paralelos que ocupan estos orbitales electrónicos libres. Sin embargo, los pares de electrones comúnmente tienen espines opuestos y así, afortunadamente imponen una restricción en la reacción del oxígeno triplete con más moléculas orgánicas. El estado basal del oxígeno puede ser convertido en muchas especies reactivas oxidantes (ROS), formados por la energía de transporte por reacciones de



antiinflamatorias. Adicionalmente a las fuentes endógenas, la producción de radicales se ve influenciada por factores ambientales externos como lo son los componentes del humo del cigarro, los contaminantes ambientales, las radiaciones gamma y la luz ultra violeta (Ferrer *et al.*, 1999).

2.10.1.2. Efectos nocivos

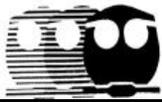
Con las evidencias anteriores se deduce claramente que los radicales pueden causar daño, incluso la muerte celular por interacción con las diferentes macromoléculas. A continuación se exponen las reacciones entre las macromoléculas y los radicales libres:

Lípidos. El radical $\cdot\text{OH}$ ataca las cadenas laterales de los ácidos grasos de los fosfolípidos membranales originando radicales peroxilo. Los nuevos radicales tienen la capacidad de atacar los fosfolípidos adyacentes en un intento por estabilizar su estructura, generándose una reacción en cadena llamada lipoperoxidación (Velázquez *et al.*, 2004).

Proteínas. Algunas cadenas laterales de los aminoácidos que conforman a las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, en consecuencia, las proteínas pueden perder su estructura cuaternaria y finalmente, su actividad biológica (Velázquez *et al.*, 2004).

Carbohidratos. Los monosacáridos oxidados por los radicales libres pueden combinarse con los grupos carbonilos de las proteínas (Velázquez *et al.*, 2004).

Ácidos nucleicos. La interacción de los radicales libres con estas moléculas causa cambios conformacionales por la modificación de las bases nitrogenadas y pérdida



de nucleótidos. Lo anterior conlleva a mutaciones y carcinogénesis, pérdida de la expresión por daño a un gen específico (Velázquez *et al.*, 2004).

2.10.3. Sistema de defensa contra el estrés oxidativo

Los efectos biológicos de los radicales libres son controlados en los seres vivos por una gama de mecanismos fisiológicos, tanto enzimáticos, así como también mecanismos no enzimáticos (Ferrer *et al.*, 2004).

2.10.3.1. Sistemas enzimáticos

En primer lugar, se cuenta con el sistema enzimático de defensa antioxidante que está constituido por tres enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSP) y la catalasa (CAT). Éstas sólo eliminan las sustancias potencialmente iniciadoras de la oxidación y no intervienen en las reacciones desencadenadas por las especies reactivas (Ferrer *et al.*, 2004).

La SOD es una de las formas de los antioxidantes intracelulares más efectivas y cataliza la conversión de aniones superóxido a moléculas de peróxido de hidrógeno. Existen varias isoformas de SOD que difieren en la naturaleza del centro del metal activo, su composición en sus aminoácidos, los cofactores y otras formas. Hay tres formas de SOD humanas, Cu-SOD citosólica, Zn-SOD, Mn-SOD mitocondrial y SOD extracelular (Landis *et al.*, 2005). La SOD neutraliza iones superóxidos a través de ciclos oxidativos y reductivos sucesivos de iones metálicos de transición en el sitio activo (Chaudieré *et al.*, 1999).

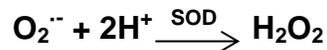
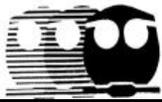


Figura 4. Reacción catalizada por la SOD (Nacher *et al.*, 2007).

La CAT es una enzima que está presente en las peroxisomas de células aeróbicas y es muy eficiente en la promoción de la conversión de peróxido de hidrógeno a moléculas de agua y oxígeno. La CAT es una de las enzimas catalizadoras más rápida entre las demás enzimas existentes, pues una molécula de catalasa puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno a moléculas de agua y oxígeno por minuto (Mates *et al.*, 1999).

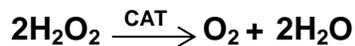


Figura 5. Descomposición del peróxido de hidrógeno en especies neutras (Nacher *et al.*, 2007).

La GSP posee dos isoformas, una que es dependiente de selenio y otra que es independiente de selenio y las diferencias son debidas al número de subunidades, los mecanismos catalíticos y los centros activos de enlace del selenio. El metabolismo del glutatión es una de los mecanismos de defensa antioxidante más importantes presentes en las células. Existen cuatro formas de GSP dependientes de selenio presentes en las personas (Chaudieré *et al.*, 1999) y éstas se conocen por la adición de dos electrones para reducir peróxidos para formar selenoles (Se-OH) y las propiedades antioxidantes de estas enzimas de selenio permiten la eliminación de peróxidos como sustratos potenciales por la reacción de Fenton. Las GSP independientes de selenio actúan en asociación con glutatión tripéptido



(GSH), que está presente en grandes concentraciones en células y cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos a agua o alcoholes mientras simultáneamente oxida la GSH. Éste también compite con la CAT por el peróxido de hidrógeno como un sustrato y es la mayor fuente de protección contra los niveles bajos de estrés oxidativo (Chaudieré *et al.*, 1999).

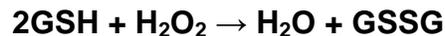


Figura 6. Descomposición del peróxido de hidrógeno por el glutatión en conjunto con la glutatión peroxidasa (Reproducido de Matsson *et al.*, 1998).



Figura 7. Regeneración del glutatión oxidado (GSSG) que será reconstituido por la acción del glutatión tripéptido y NADPH (Modificado de Matsson *et al.*, 1998).

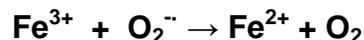


Figura 8. Serie de reacciones en la formación de ROS, donde se involucra la reacción de Fenton (Ferrer *et al.*, 1999).

Además se cuenta con proteínas como la ferritina, transferrina y la ceruloplasmina que se unen a metales limitando la disponibilidad del hierro necesario para formar el radical $\cdot\text{OH}$ por la reacción de Fenton.



2.10.3.2. Sistemas no enzimáticos

Por otro lado, se encuentra la activación no enzimática que consiste en la acción de sustancias como la ubiquinona, los tocoferoles, los carotenoides y el ácido ascórbico. Se les denominan “antioxidantes verdaderos” porque intervienen en la cadena de formación de radicales libres, convirtiendo a los hidroperóxidos y radicales en compuestos estables, inactivando a los radicales lipídicos y dando lugar a la formación de un radical más estable, por lo que se denominan “scavengers” (atrapadores). La efectividad de estos antioxidantes es dependiente de sus propiedades químicas como las energías de enlace, la posibilidad de formación de distintas estructuras resonantes del radical formado y la susceptibilidad a la oxidación, que está determinado por el valor del potencial estándar de reducción (Ferrer *et al.*, 1999). Así como de su disponibilidad en el organelo y el lugar de la formación de los radicales.

Tocoferoles. La vitamina E es una vitamina soluble en grasas que existe en ocho isoformas. En los humanos, el α -tocoferol es la forma más activa y es la de mayor potencial membranal con propiedades antioxidantes empleada por la célula (Hensley *et al.*, 2004). La principal función de la vitamina E es proteger contra la peroxidación lipídica y existe evidencia que sugiere que el α -tocoferol y el ácido ascórbico funcionan juntos en un proceso de tipo cíclico. Durante la reacción antioxidante, el α -tocoferol es convertido a un radical de α -tocoferol por la donación de un hidrógeno lábil a un lípido o a un radical peroxil lipídico y el radical α -tocoferol puede por lo tanto ser reducido a su forma original α -tocoferol por el ácido ascórbico (Kojo, 2004).



Ácido ascórbico. La vitamina C o también denominado ácido ascórbico, es un importante y poderoso antioxidante soluble en agua y se desempeña por lo tanto en medios acuosos en el cuerpo. Es el antioxidante compañero primario de la vitamina E y de los carotenoides, así como también trabaja en conjunto con enzimas con función antioxidantes. La vitamina C coopera con la vitamina E en la regeneración del α -tocoferol procedentes de los radicales de α -tocoferol en membranas y lipoproteínas (Kojo, 2004) y también aumenta los niveles de del glutatión intracelular, siendo de esta manera que juega un papel importante en la protección de proteínas con grupos de tioles contra la oxidación (Naziroglu *et al.*, 2005).

Por otra parte, es importante mencionar que también tiene la capacidad de secuestrar metales y por lo tanto, de neutralizar la actividad de los mismos. Las ROS como el oxígeno singulete y el radical superóxido, como se muestran en la **Figura 9** (Ferrer *et al.*, 2009).

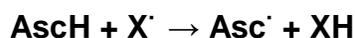
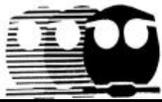


Figura 9. Estabilización del radical libre por el ácido ascórbico.

Posteriormente el ascorbato es regenerado por medio de la reducción en sistemas enzimáticos de NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato) o NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina).

Ubiquinona. La ubiquinona también llamada coenzima Q, se encuentra en la membrana mitocondrial de las células donde participa como componente esencial de la cadena transportadora de electrones. La forma reducida neutraliza radicales peroxilo, pero con menos eficacia que los tocoferoles. Se encarga de regenerar al



α -tocoferol según la siguiente ecuación que se muestra en la **Figura 10** (Ferrer *et al.*, 1999).

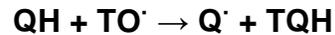


Figura 10. Regeneración del radical tocoferilo por la ubiquinona (Ferrer *et al.*, 1999).

Carotenoides. Los carotenoides son compuestos liposolubles susceptibles a la oxidación, por ejemplo al ataque de radicales peroxilo, los cuales no son capaces de abstraer el hidrógeno del carotenoide por lo que adicionado al sistema conjugado, se da lugar a la formación de un aducto. **Figura 11** (Ferrer *et al.*, 2009).

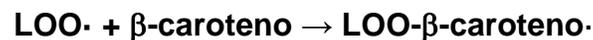
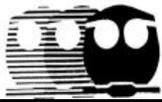


Figura 11. Reacción del radical peroxilo con la molécula de β -caroteno para formar el aducto correspondiente (Ferrer *et al.*, 2009).

Los carotenoides son buenos protectores de la oxidación lipídica catalizada por la luz ya que interfiere en la activación del oxígeno triplete a singulete. El β -caroteno no es destruido por este proceso ya que regresa al estado fundamental disipando la energía en forma de calor (Ferrer *et al.*, 1999).

2.10.4. Antioxidantes

Un antioxidante puede ser definido como cualquier tipo de sustancia que retarda, previene o remueve el blanco del daño oxidativo de una molécula (Procházková *et al.*, 2011). Esto es posible mediante el cede de electrones a radicales que son



estabilizados, consiguiendo un combate en la degeneración y muerte de células. El radical en la molécula libre es inocuo pues posee la capacidad de deslocalizar el electrón debido a su estructura. Su acción la realiza mediante medios hidrofílicos como hidrofóbicos (Venéreo, 2002).

2.10.4.1. Clasificación

Los flavonoides pueden ser clasificados bajo diversos criterios debidos a su origen, sitio donde ejercen su acción y la fuente. A continuación se muestra una descripción de cada una de estas clasificaciones:

a) Debido a su origen (Venéreo, 2002).

- Endógenos. Constituidos por los mecanismos de defensa del propio organismo. Por ejemplo: SOD, GSP, catalasa, tocoferol, ubiquinona, carotenoides y el ácido ascórbico.
- Exógenos. Son aquéllos que son adquiridos por medio de la dieta. Principalmente se encuentran:
 - Vitamina E: Es el antioxidante por excelencia de los medio lipídicos del organismo. Se encuentran en el aceite de soya, aceite de oliva, almendra, cacahuate, mantequilla, huevo, leche entera, etc. (Lima, 2002).
 - Vitamina C. Es el principal agente antioxidante en los medios acuosos del organismo. Gracias a su potencial de oxidación/reducción evita en su presencia se oxiden otros compuestos. Debido a su naturaleza hidrosoluble

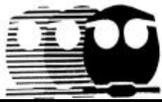


es eliminada del organismo, por lo que debe ingerirse con frecuencia. Esta vitamina se encuentra en las frutas crías, los pimientos crudos, la alfalfa, el perejil, el hinojo, la col de Bruselas, la coliflor, el kiwi y otras verduras (Lima, 2002).

- Flavonoides. Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo (Lima, 2002). La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus excelentes quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, así como la inhibición de oxidasas tales como la lipoxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa (COX), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa. Otros mecanismos incluyen la inhibición de enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, este es el caso de la fosfolipasa A2 (FLA2) y la estimulación de la catalasa y el superóxido dismutasa (Martínez *et al.*, 2002).

b) Según el sitio donde ejercen su acción (Venéreo, 2002).

- Intracelular
 - Superóxido dismutasa.
 - Catalasa.
 - Peroxidasa.
 - Glutación peroxidasa.
 - Proteínas que ligan metales.
- Membrana
 - Vitamina E.
 - β -carotenos.



- Ubiquinol-10.
- Extracelulares
 - Ceruloplasmina.
 - Transferinas.
 - Lactoferrinas.
 - Albúminas.
 - Haptoglobinas.
 - Vitamina C.
 - Ácido úrico.
 - Vitamina E.

c) Según su fuente (Iglesias, 2009).

- Naturales. Obtenidos principalmente de plantas y vegetales, por ejemplo el eugenol, ácidos cafeíco y ferúlico, ácido clorogénico, apigenina, entre otros.
- Sintéticos. Aquéllos sintetizados como *ter*-butilhidroxitolueno (BHT), el *ter*-butilhidroxianisol (BHA) y la *ter*-butilhidroxiquinona (TBHQ).

2.10.4.2. Actividad antioxidante de flavonoides *in vitro*

Las capacidades antioxidantes de muchos flavonoides son muy fuertes, incluso igual o más a las presentadas por las vitaminas C y E (Prior *et al.*, 2000). Por ejemplo, el potencial de reducción de un electrón del galato de epigallocatequina bajo condiciones estándar es de 550 mV, un valor más bajo que el del glutatión (920 mV) y comparable al del α -tocoferol (480 mV) (Jovanovic *et al.*, 1996; Jovanovic *et al.*, 1997; Frei *et al.*, 2003; Maeta *et al.*, 2007). Los flavonoides pueden prevenir daños causados por radicales libres por medio de los siguientes mecanismos (Procházková *et al.*, 2011):

1. Atrapamiento directo de especies reactivas oxidantes (ROS).



2. Activación de enzimas antioxidantes (Nijveldt *et al.*, 2001).
3. Actividad quelante de metales (Ferralli *et al.*, 1997).
4. Reducción de radicales α -tocoferol. (Hirano *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002).
5. Inhibición de oxidasas (Cos *et al.*, 1998; Heim *et al.*, 2002).
6. Mitigación de estrés oxidativo causado por óxido nítrico (Van Acker *et al.*, 1995).
7. Aumento de los niveles de ácido úrico (Lotito *et al.*, 2006).
8. Aumento en propiedades antioxidantes de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular (Yeh *et al.*, 2005).

2.10.4.2.1. Atrapamiento directo de ROS

Los flavonoides son capaces de buscar y encontrar radicales libres directamente por la donación de átomos de hidrógeno. Los radicales se inactivan de acuerdo a las siguiente ecuación, donde $R\cdot$ es el radical libre y $Fl-O\cdot$ es un radical fenoxyl flavonoide (**Figura 12**).

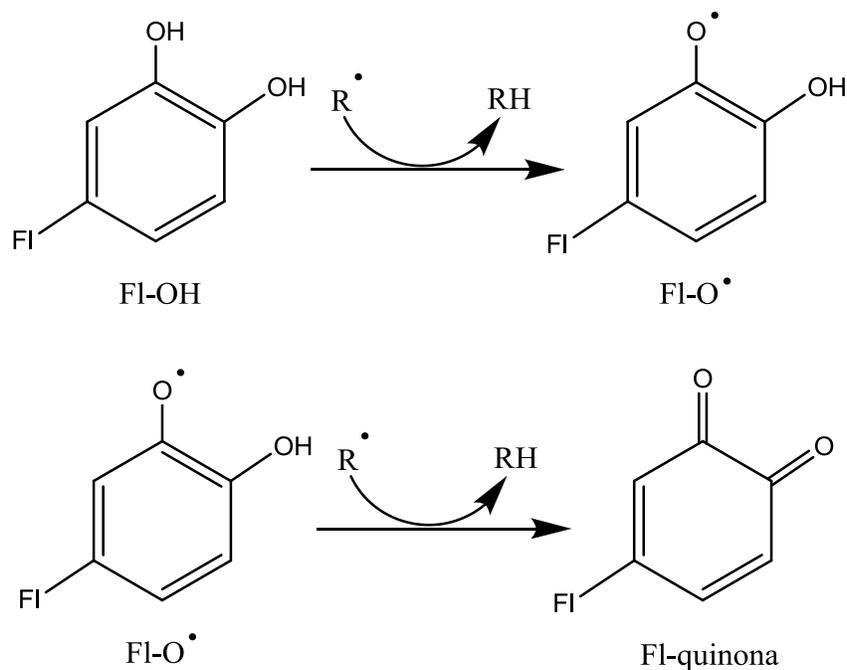


Figura 12. Búsqueda de especies reactivas de oxígeno (R•) por flavonoides. El radical libre FI-O• puede reaccionar con un segundo radical, adquiriendo una estructura de quinona estable (Pietta, 2000).

La actividad antioxidante de los flavonoides *in vitro* depende en los arreglos de los grupos funcionales en su estructura nuclear. Tanto la configuración, como el número de grupos hidroxilos influyen de forma importante en el mecanismo de la actividad antioxidante (Heim *et al.*, 2003). La distribución de hidroxilos en el anillo B, es el más determinante e importante para atrapar ROS (Burda *et al.*, 2001), mientras la sustitución de los anillos A y C tienen menor impacto en el atrapamiento de radicales de aniones superóxido de forma constante (Tauberet *et al.*, 2003; Amic *et al.*, 2007).

La actividad antioxidante *in vitro* debería aumentar por la polimerización de monómeros de flavonoides, por ejemplo, las proantocianidinas (también conocidas

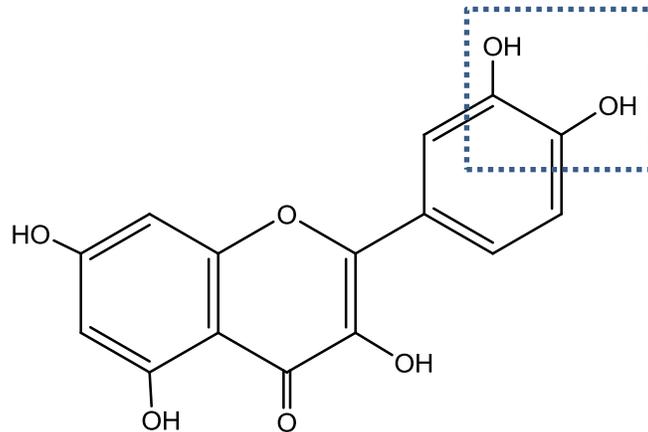


como taninos condensados), los polímeros de catequinas, son excelentes antioxidantes *in vitro* debido a su alto número de grupos hidroxilos en sus moléculas. La capacidad antioxidante de las proantocianidinas depende de su cadena larga oligomérica y del tipo de las ROS con que reaccionan (Lotito *et al.*, 2000). La glicosilación de flavonoides reduce su capacidad antioxidante *in vitro* cuando se les compara con su correspondiente aglicona (Rice *et al.*, 1996; Khkhen *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2003; Amic *et al.*, 2010; Cavia *et al.*, 2010). De acuerdo a Rice y sus colaboradores, comparando los valores de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de quercetina y rutina, quercetina-3-O-rutinósido, se observa que la glicosilación del grupo 3-OH tienen un fuerte efecto supresivo en la actividad antioxidante. Resultados similares también fueron observados con otros pares de flavonoides-aglicona y glicósido, por ejemplo hesperitina-hesperidina, luteolín-luteolín 4'-glucósido; luteolín-luteolín-7'-glucósido, baicaleina-baicalina; quercetina-quercetrina, etc. (Rice *et al.*, 1996; Amic *et al.*, 2010). La glicosilación de la quercetina también reduce significativamente la habilidad del atrapamiento de los superóxidos (Sun *et al.*, 2010), la actividad de atrapamiento de hipocloritos (Firuzi *et al.*, 2004) y el poder de reducir el Fe (III) a Fe (II) (determinado por el ensayo de FRAP) (Firuzi *et al.*, 2005).

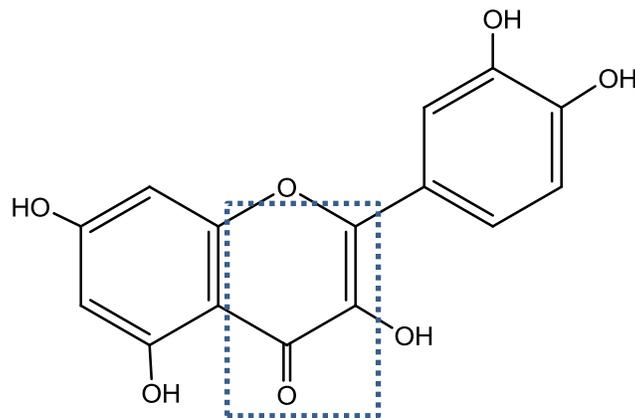
Las estructuras generales características de flavonoides necesarias para un eficiente atrapamiento de radicales se resume en los siguientes puntos (Bors *et al.*, 1990; Croft, 2006):



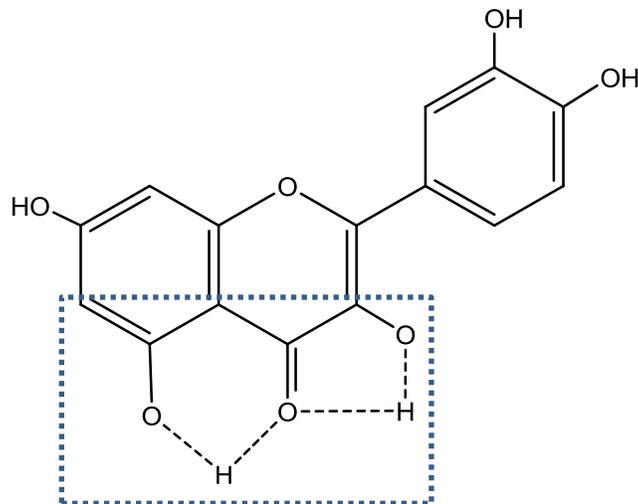
- Una estructura orto-dihidroxi (catecol) en el anillo B, para deslocalizar al electrón:



- Enlace doble en 2,3 en conjugación con un 4-ceto funcional en el anillo C, proporciona deslocalización electrónica del anillo B.



- Grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5 proporciona hidrógenos que se enlazan al grupo ceto.



2.10.4.2.2. Habilidad de activar enzimas antioxidantes.

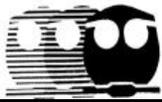
Otro mecanismo posible por el cual los flavonoides actúan es a través de la interacción con diversas enzimas antioxidantes. Es más, algunos efectos pueden ser un ajuste de una combinación del radical atrapado y la interacción con las funciones de la enzima (Nijvelt *et al.*, 2001).

Los flavonoides son capaces de inducir a fase II en la detoxificación enzimática (por ejemplo NAD(P)H-quinona oxidoreductasa, glutatión S-transferasa y UDP-glucuronosil transferasa), que son las mayores defensas enzimáticas contra toxinas electrofílicas y estrés oxidativo. La regulación de la expresión de este gen protector puede ser mediado por un elemento receptor electrofílico (EpRE), que es una secuencia regulatoria de un número de genes que codifican estas enzimas de fase II (Zhu *et al.*, 2001; Nerland *et al.*, 2007). La capacidad de los flavonoides para activar la mediación de EpRE relaciona la respuesta con sus propiedades redox. Lee y sus colaboradores observaron que la activación de la ¹luciferasa reporta que el gen en células hepáticas de ratón Hepa-1c1c7, enciende la



inducción con flavonoides de estructura diferentes. Los inductores más efectivos fueron los flavonoides que contienen un grupo hidroxilo en la posición 3 en el anillo C (quercetina y miricitina), mientras los flavonoides sin estos grupos hidroxilo (luteolín y galangina) sólo fueron bajos inductores de luciferasa. Por lo tanto, flavonoides con un alto potencial intrínseco para generar estrés oxidativo y ciclo redox, son los inductores más potentes de la expresión de genes mediados a EpRE. Si puede concluirse la actividad prooxidante de los flavonoides, pueden contribuir a una actividad que promueve la salud para inducir la desintoxicación importante de enzimas, centrado en un efecto benéfico, suponiendo una reacción química tóxica (Lee *et al.*, 2006).

Nagata y sus colaboradores investigaron el efecto citoprotectivo de la quercetina y la catequina contra peróxidos hidrogenados citotóxicos en cultivos de hepatocitos de rata BL-9, que son células que expresan altamente glutatión peroxidasa citosólico (GPx). Los autores describen que la actividad protectora de los flavonoides probados están relacionados a la activación de GPx. (Nagata *et al.*, 1999). Por su parte, Martín y sus colaboradores describieron la activación de las proteínas de señalamiento únicas (Proteína cinasa B y las cinasas reguladoras extracelulares) y el aumento en las actividades de GPx y de glutatión reductasa (GR) en hepatocitos humanos causado por los flavonoides presentes en la cocoa (Martín *et al.*, 2010). Por su parte, el equipo de Leung proporcionó evidencia de que el luteolín induce apoptosis en células con carcinoma pulmonar humano CH27 y que están acompañadas por la activación de enzimas antioxidantes, tales como el superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), pero no a través de la



producción de ROS, ni la interrupción del potencial de la membrana mitocondrial. Por lo tanto, los efectos de luteolín en células con apoptosis CH27 fueron supuestas al resultar de los antioxidantes suficientes, debida a la acción del prooxidante de este compuesto (Leung *et al.*, 2006). La administración de grandes fracciones ricas en flavonoides con una dieta alta en grasas causa un importante aumento de la actividad de SOD, CAT y GPx en eritrocitos de rata (Kaviarasan *et al.*, 2008). Resultados similares se observaron también después de administrar naringina a voluntarios hipercolesterolémicos (Jung *et al.*, 2003).

Sin embargo, algunas observaciones contradictorias, se obtuvieron en este campo de estudio, por ejemplo, se observó que la actividad del glutatión S-transferasa (GST) fue inducido significativamente por apigenina, genisteína y tangeretina en corazón de rata pero no en colon o hígado. En glóbulos rojos, la crisina, quercetina y genisteína disminuyeron de forma importante la actividad de GR, CAT, y GPx, mientras la actividad de SOD sólo disminuyó con genisteína. (Breinholt *et al.*, 1999).

2.10.4.2.3. Actividad quelante de metales

Flavonoides específicos son conocidos por quelar hierro y cobre, de este modo, remueven un factor causante para el desarrollo de radicales libres. La quercetina es capaz de prevenir daños oxidativos inducida en la membrana de los eritrocitos por un número de agentes oxidantes (por ejemplo la acroleína y la fenilhidrazina), que causan la liberación de hierro, esta es la forma activa redox (Nijveldt *et al.*, 2001). Pietta propuso que el enlace de sitios para trazas de metales en la molécula de los flavonoides está en la fracción del catecol en el anillo B, los



grupos 3-hidroxilo y 4-ceto en el anillo heterocíclico C, y los grupos 4-ceto y 5-hidroxilo entre los anillos C y A (**Figura 13**).

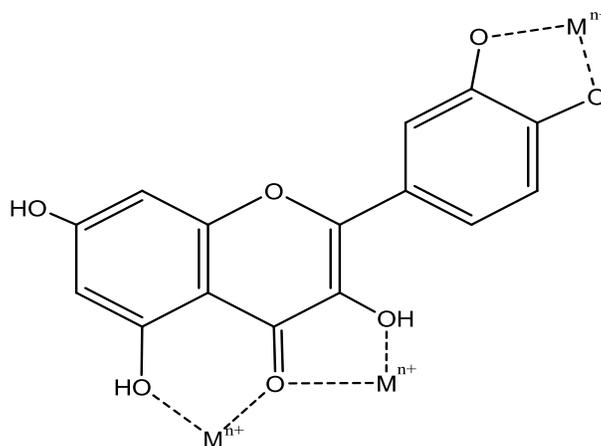
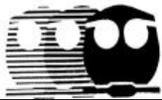


Figura 13. Sitios de enlace para trazas de metales (Pietta, 2000).

La fracción del catecol en el anillo B ha mostrado su importancia al formar compuestos quelantes con Cu^{2+} y así ser el sitio de quelación para metales de mayor contribución (Brown *et al.*, 1998). La quercetina en particular, es conocida por la quelación de hierro y estabilizador de éste, al mismo tiempo. La morina y la quercetina muestran complejos formados con Cd (II) y exhiben una fuerte actividad antioxidante en estudios *in vitro*. Sus derivados sulfúricos derivados en agua ejercen baja toxicidad y por lo tanto, son potentes antídotos en intoxicaciones con cadmio (Kopacz *et al.*, 2003; Szelag *et al.*, 2003; Chlebda *et al.*, 2010).

2.10.4.2.4. Reducción de radicales α -tocoferol

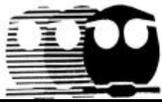
El α -tocoferol representa un antioxidante fuerte en la membrana celular y en las lipoproteínas de baja densidad humana (LDL) que protegen partículas lipoproteicas contra daños oxidativos. Hirano y colaboradores sugieren que los



flavonoides pueden actuar como donadores de hidrógenos a radicales α -tocoferol, que es un potente prooxidante (Hirano *et al.*, 2001). De esta forma, por interacción con un radical α -tocoferol, poseen un gran potencial para demorar la oxidación de las LDL. Los flavonoides (kaempferol, morina, miricetina y quercetina) muestran una actividad protectora variada contra la depleción de α -tocoferol en las LDL, con kaempferol y morina es menos efectiva que con miricetina y quercetina (Zhu *et al.*, 2000). Las catequinas pueden ser incluso más efectivas que el ascorbato en la regeneración de α -tocoferol en solución micelar (Mukai *et al.*, 2005). Similarmente, la adición de extractos de catequina presentes en té verde (epigallocatequina, galato de epigallocatequina, epicatequina y galato de epicatequina) han demostrado una regeneración gradual de α -tocoferol en LDL humana (Zhu *et al.*, 1999). Estas observaciones fueron basadas por el bajo valor de los potenciales redox de algunos flavonoides (por ejemplo, la quercetina $E=0.2$ V o la catequina $E=0.4$ V) (Pietta, 2001).

2.10.4.2.5. Capacidad de inhibir oxidasas

Los flavonoides inhiben las enzimas responsables de la producción de superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), tales como la xantina oxidasa (Hanasaki *et al.*, 1994) y la proteína cinasa C (Ursini *et al.*, 1994). La quercetina y la silibina inhiben la actividad de la xantina oxidasa, de esta forma, resulta la disminución del daño oxidativo (Iio *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1993; Shoskes, 1998; Nijveldt *et al.*, 2001). También se han realizado estudios enfocados en la actividad relacionada con la estructura, en el cual, el luteolín se reportó como un potente inhibidor de la xantina



oxidasa (Cos *et al.*, 1994). Los flavonoides también han mostrado que inhiben la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la succinoxidasa microsomal y la NADH oxidasa (Brown *et al.*, 1994; Korkina *et al.*, 1997).

La NADPH oxidasa es un sistema asociado a la membrana, catalizando la producción de $O_2^{\cdot -}$ en neutrófilos activados. El mecanismo de activación incluye la interacción de un agonista con un receptor específico en la membrana del neutrófilo, la activación de la fosfolipasa C con la subsecuente formación de segundos mensajeros, que activan la proteína cinasa C. Esta enzima fosforila la subunidad p47phox de la NADPH oxidasa, un componente principal de esta enzima y así causa la activación de la combustión respiratoria (Umeki *et al.*, 1994; Ago *et al.*, 2003). La inhibición de la proteína cinasa C fue sugerida al ser un mecanismo en la inhibición de NADPH oxidasa por la quercetina (Ursini *et al.*, 2004). Los flavonoides inhibidores más potentes de la proteína cinasa C (quercetina, fisetina y luteolina) poseen una estructura coplanar tipo flavona con sustituyentes hidroxilos libres en las posiciones 3', 4' y 7 (Ferriola *et al.*, 1989).

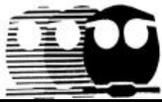
2.10.4.2.6. Modulación del estrés oxidativo causado por óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es importante en el mantenimiento de la dilatación de los vasos sanguíneos (Huk *et al.*, 1998), pero en altas cantidades puede resultar en daño oxidativo. NO es producido por la oxidación de L-arginina catalizado por NO sintasas (NOS). La toxicidad del óxido nítrico es mayormente mediado por peroxinitrito, que se forma por la reacción de NO con $O_2^{\cdot -}$ (Rubbo *et al.*, 1994).



Los flavonoides ejercen la actividad inhibitoria en la producción de NO en varios tipos de células que activan lipopolisacáridos y su entorno (macrófagos peritoneales de ratón). Este efecto probablemente fue causado por el efecto de flavonoides inhibitorios en la expresión de inducción de NOS pero no por la inhibición de la actividad de éste (Kim *et al.*, 1999; Olszanecki *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2003;). Varias estructuras requieren de flavonoides para que esta actividad fuera determinada: La presencia de enlaces dobles 2,3 con el grupo 4-ceto y de los grupos trihidroxilos 3, 5,4' son muy importantes. Su actividad, incluso se vio mejorado al metilar los grupos hidroxilos 3,5 y 4' y reducir la parte glicosilada y el catecol o los arreglos en el anillo B del pirogalol. De esta forma, la apigenina, la disomentina y la luteolina se encuentran en cantidades naturales, presentes en flavonas con la actividad inhibitoria más potente (Kim *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2003; Olszanecki *et al.*, 2002). Estos flavonoides pueden, algunas veces aumentar la actividad de la NOS endotelial. Muchos flavonoides, incluyendo la quercetina, resultan en una reducción de daños de reperfusión isquémica por la intervención con la inducción de la actividad de NOS (Ursini *et al.*, 1994; Nijveldt *et al.*, 2001). Los flavonoides también poseen la capacidad de atrapar moléculas de NO (Prior *et al.*, 2000).

No se sabe con exactitud, cómo es que los flavonoides inhiben la inducción de NOS y la producción de NO aún no está claramente entendida, pero existen varias teorías. La primera posibilidad puede derivarse de la propiedad antioxidante de los flavonoides porque estos compuestos son atrapadores de ROS. La segunda



posibilidad es que los flavonoides puedan actuar como moléculas inhibidoras de señales de los lipopolisacáridos (Kim *et al.*, 2005).

Se sabe que los flavonoides son atrapadores directos de peroxinitritos (Cao *et al.*, 1997). La determinación más importante es su actividad contra peroxinitrito, que está en el arreglo 3',4' del catecol, seguido por una destitución del grupo hidroxilo en la posición 3. Una relación aparentemente positiva entre el número de grupos hidroxilos, particularmente en el anillo B, y la actividad antirradical se ha descrito en artículos publicados con anterioridad (Haenen *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2003).

2.10.4.2.7. Aumento en los niveles de ácido úrico

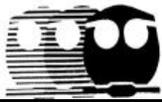
Existen grandes discrepancias entre la capacidad antioxidante total en suero o plasma y las concentraciones de flavonoides presentes sólo en plasma. Lotita y Frei determinaron que la prolongación del aumento de la capacidad antioxidante total en suero, después de consumir alimentos ricos en flavonoides, no era causa sólo por flavonoides, pero está ligado en consecuencia al aumentar los niveles de ácido úrico también, que es una contribución mayor a la capacidad antioxidante total en plasma. Cao y sus colaboradores reportan un aumento significativo de urato en plasma o suero después del consumo de fresas, espinacas o vino tinto (Cao *et al.*, 1998). Aumentos similares de urato en plasma o suero se describieron después de beber vino (Day *et al.*, 1995), té o café (Natella *et al.*, 2002). Así, varios estudios indican que el consumo de alimentos ricos en flavonoides pueden aumentar el urato en plasma, aunque el mecanismo subyacente permanece un



poco desconocido. Por otro lado, desde que se elevan las concentraciones de urato, podría convertirse en un factor riesgoso para algunas enfermedades, el supuesto beneficio antioxidante, puede no ser lo que parece (Halliwell *et al.*, 2007).

2.10.4.2.8. Modificación de las propiedades prooxidantes de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular

Varios autores describen la actividad de β -caroteno bajo ciertas condiciones (por ejemplo con radiación UV) y sugieren que en combinación con un antioxidante pueden tener un efecto preventivo (Obermüller *et al.*, 1999; Offford *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha investigado la interacción de β -caroteno con naringina, rutina y quercetina en daños en DNA inducida por radiación UV en células fibroblásticas embrionarias de ratón. Donde cada flavonoide fue combinado con β -caroteno durante la preincubación, el daño celular en DNA inducido por radiación UV, de tal forma que los flavonoides suprimieron significativamente el daño, lo que propició que los efectos antioxidantes más fuertes se dieran en el orden siguiente, con los flavonoides antes mencionados: Naringina \geq rutina $>$ quercetina, lo que sugiere que en combinación con alguno de estos flavonoides, el β -caroteno aumenta la eficacia antioxidante (Yeh *et al.*, 2005).



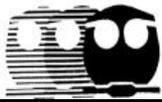
2.10.4.3. Metabolismo de flavonoides y actividad antioxidante de sus metabolitos *in vitro*

Aunque los flavonoides retardan la potencia de la actividad antioxidante *in vitro*, las formas bioactivas de los flavonoides *in vivo* no son las formas encontradas en la planta (por ejemplo los flavonoides glicosilados) debido a su extensa biotransformación en el intestino delgado y el metabolismo y absorción hepática. Estos cambios metabólicos incluyen una extensa fase I de glicosilación de flavonoides glicosilados y del metabolismo en fase II incluyendo glucuronidación, sulfatación y O-metilación resultando en agliconas (Rice *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2007). También la microflora colonial participa en el metabolismo de los flavonoides. Las enzimas bacteriológicas pueden catalizar una amplia variedad de reacciones, incluyendo hidrólisis de glucurónidos, sulfatos y glicósidos, deshidroxilación, desmetilaciones, reducción de enlaces dobles, división de anillos y descarboxilación de algunos ácidos fenólicos (Homan *et al.*, 1998; Stahl *et al.*, 2002). El tipo de fisión de anillo depende del tipo de flavonoide (Homan *et al.*, 1998). Además, los flavonoides pueden experimentar por lo menos tres formas en el metabolismo intracelular: Metabolismo oxidativo, metabolismo relacionado a P450 y conjugación con tioles, particularmente en la reducción de glutatión (GSH) (Spencer *et al.*, 2001; Breinholt *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2003). Por ejemplo, el flavonoide de quercetina está en el organismo metabolizado al extender una pequeña o no aglicona libre, que se encuentra en plasma. La mayor forma biodisponible en animales y humanos son representadas por quercetinas conjugadas, llamados glucurónidos, glucurónidos O-metilados y



derivados sulfatados (Breinholt *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2003; Pollard *et al.*, 2006). Los mayores metabolitos reportados *in vivo* de este flavonol son el 3'-O-metil quercetina, 4'-O-metil quercetina y quercetina 7-glucurónido. Después de que las personas consumen cebolla, también los metabolitos de quercetina 3'-sulfato y quercetina 3-glucurónido se encuentran en plasma (Stahl *et al.*, 1998). Igualmente los flavan-3-oles tal como la catequina y la epicatequina se transforman en glucurónidos y sulfatos conjugados en absorción también como derivados O-metilados (Piskula *et al.*, 1998; Spencer *et al.*, 2003; Pollard *et al.*, 2007).

Los metabolitos de los flavonoides (circulando también intracelularmente) poseen una gran reducción del potencial antioxidante *in vitro* comparado con el flavonoide inicial, porque se bloquean los grupos hidroxilos que atrapan radicales libres (Pollard *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2003; Lemánska *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2010). La O-metilación y los derivados glucuronidados de quercetina, (-)-epicatequina, catequina y luteolina poseen más bajo poder antioxidante (determinado por el ensayo de TEAC) que su correspondiente aglicona (Lemánska *et al.*, 2004; Pollard *et al.*, 2006; Dueñas *et al.*, 2010). La glucuronidación y la O-metilación causan también una disminución en la habilidad de la quercetina y (-)-epicatequina de inhibir tirosina nitrada inducida por peroxinitrito de estos compuestos, comparadas con su respectiva aglicona (Pollard *et al.*, 2006). Hay evidencia de que la habilidad de la quercetina, catequina y epicatequina al reducir Fe (III) a Fe (II) determinado por el ensayo de FRAP fue mayormente reducido por metilación de todos los flavonoides en las posiciones 3' y 4' del anillo B (Dueñas *et*



al., 2010). Estos descubrimientos indican que la modificación metabólica actual *in vivo* puede influenciar de forma importante la actividad antioxidante de los flavonoides en los alimentos. Además, las propiedades prooxidantes de los metabolitos de los flavonoides han sido descritos actualmente *in vivo* (Metodiawa *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2003). Se ha descrito que la actividad de algunos metabolitos de la quercetina (aquellos con una fracción de catecol libre, un grupo hidroxilo libre, ambos en la posición 3) estimula la vía de producción de radicales superóxido y peróxidos de hidrógeno. Al parecer, al evitar el entorno prooxidante de los metabolitos de quercetina, los grupos hidroxilos en posición 3 deberían bloquearse para prevenir la auto-oxidación (Kessler *et al.*, 2003).

2.10.4.4. Actividad antioxidante de flavonoides *in vivo* y sus metabolitos

Suplementando procianidinas en ratas, se ha asociado positivamente a un aumento de actividad antioxidante en plasma (Facino *et al.*, 1999). De igual forma, se ha determinado que los flavonoides tienen una potencia favorable al desarrollar actividades hepatoprotectivas e hipolipidémicas, del cual, los niveles pueden ser mediados, en parte, por el mejoramiento del sistema de defensa antioxidante (Liu *et al.*, 2010).

En consideración, los posibles mecanismos bioactivos de acción de los flavonoides y sus metabolitos en sistemas celulares, son importantes y se debe considerar su comportamiento y su posible metabolismo más a fondo en las células. Por ejemplo, la (-)-epicatequina y la catequina se acumula principalmente como glucurónidos y sulfatos conjugados en plasma sanguínea después de



administrarle por vía oral a ratas, sin embargo, la quercetina no se encuentra intacta en circulación, pero en la administración oral de estos flavonoides, la capacidad antioxidante de los metabolitos conjugados participan en la defensa antioxidante (Terao *et al.*, 1999).

El patrón metabólico de la quercetina depende de la vía de administración. Cuando Santos y colaboradores, alimentaron ratas con suplemento alimenticio, con un 0.02% de quercetina por 3 semanas, los metabolitos más abundantes en plasma fueron el 3'-O-metil quercetina (isoramnetina), glucurónidos y sulfatos conjugados. La conjugación más convincente se da en las posiciones 3-, 5- y 7-, donde se encuentran los hidroxilos. La isoramnetina conjugada fue metilada en la posición 3'-OH, disminuyendo de esta forma la alta actividad antioxidante de la quercetina y sus metabolitos, así como también disminuyó su contribución del potencial antioxidante en plasma. De otra forma, después de una sola administración de dosis alta, los metabolitos de la quercetina con mayor concentración fueron los conjugados en las posiciones hidroxilo 5- y 7-, respectivamente, pues se observó un incremento en la actividad antioxidante en plasma (Santos *et al.*, 2008). Se ha reportado que el estatus antioxidante del plasma es significativamente alto en ratas en que se les administró quercetina, sugiriendo que los metabolitos de quercetina pueden poseer alguna actividad antioxidante cuando el grupo O-catecol no sufre reacciones de conjugación (Justino *et al.*, 2004).

Sin embargo, describir las propiedades antioxidantes de los flavonoides y sus metabolitos *in vivo* con respecto a sus facciones estructurales es muy cambiante.



La información está limitada y disponible para estudios *in vivo* en personas, donde se administraron flavonoides puros. Los alimentos ricos en flavonoides, como el cacao, el chocolate (Cooper *et al.*, 2008; Mellor *et al.*, 2010), la cebolla (Boyle *et al.*, 2009) o bebidas como el café y/o el té verde (Fukushima *et al.*, 2009), el jugo de granada (Guo *et al.*, 2008), se han administrado en muchos estudios en lo que respecta al tema de los flavonoides, y tales alimentos contienen también otros constituyentes con la capacidad de influir daño oxidativo y así, terminar de sobreestimar el beneficio real de los flavonoides. Además, los resultados de estos estudios han sido ambiguos, algunos muestran efectos antioxidantes, otros no lo hacen y todavía algunos otros muestran un ligero efecto prooxidante (Halliwell *et al.*, 2008).

2.10.4.5. Función prooxidante directa de los flavonoides

Así como muchos flavonoides son llamados antioxidantes, muchos otros, pueden actuar como prooxidantes. Bajo ciertas condiciones y de ahí que promuevan a oxidación de otros compuestos.

La actividad prooxidante es directamente proporcional al número total de grupos hidroxilos en la molécula del flavonoide. Series de mono y dihidroxi-flavonoides han demostrado una actividad prooxidante no detectable, mientras múltiples grupos hidroxilos, especialmente en el anillo B, aumentan significativamente la producción de radicales hidroxilos en la reacción de Fenton (Hanasaki *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 2002). Los compuestos posteriores incluyen baicaleina contenida en una estructura de pirogalol en el anillo A, que también se ha reportado al promover



la producción de peróxido de hidrógeno (Hodnick *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 2002) del que radicales hidroxilos altamente reactivos pueden ser generados mediante la reacción de Fenton (Galey *et al.*, 1997; Heim *et al.*, 2002;). También hay evidencia de que el doble enlace 2,3 y el arreglo en 4-oxo en flavonas pueden promover la formación de ROS inducidas por cobre divalente en presencia de oxígeno (Sun *et al.*, 2010). Es posible que la función prooxidante del flavonoide debería ser una forma de sus funciones benéficas. Por ejemplo, el galato de epigallocatequina promueve la apoptosis y la actividad bactericida, que se le atribuye a la capacidad de reducir O_2 a H_2O_2 (Arakawa *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2004; Maeta *et al.*, 2007).

Los posibles efectos prooxidantes de los flavonoides pueden ser importantes *in vivo*, si los iones metálicos de transición libres están involucrados en el proceso oxidativo. Los flavonoides son capaces de reducir el Cu (II) a Cu (I) y así permitir la formación de radicales iniciales (Cao *et al.*, 1997). En la salud del cuerpo humano, los iones metálicos aparecen muy secuencialmente en forma de ser incapaces de catalizar reacciones con radicales libres (por ejemplo en ferritina o caeruloplasmina (Halliwell *et al.*, 1998). Sin embargo, daños a tejidos pueden liberar hierro o cobre e iones metálicos catalíticos, los cuales han sido medidos en lesiones ateroscleróticas (Stadler *et al.*, 2004). En estos casos, el potencial para flavonoides al actuar como prooxidantes no puede ser ignorado (Croft *et al.*, 2006). Las propiedades prooxidantes de los flavonoides al parecer son dependientes de la concentración. Por ejemplo, se han monitoreado las propiedades prooxidantes de la quercetina, naringina, hesperitina y morina en linfocitos humanos. Mientras la



concentración de H_2O_2 no fue detectada cuando las flavanonas naringenina y hesperina fueron añadidas en concentraciones dentro de un rango de 0-200 μM , los flavonoles quercetina y morina aumentaron la concentración de H_2O_2 en concentraciones de 25-200 μM y 125-200 μM , respectivamente. La generación de radicales de anión superóxido y productos de peroxidación lipídica (medida como sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico) aumentan con el aumento de la concentración de cada uno de estos flavonoides. Además, estos compuestos han sido capaces de inducir la ruptura de cadenas de DNA en forma dependiente a la concentración, determinado por ensayos sensitivos. Este efecto fue explicado por el mejoramiento del radical hidroxilo formado por cuatro flavonoides de prueba. La actividad prooxidante reportada ha sido relacionada a las características estructurales de estos flavonoides, cuando el compuesto con más actividad prooxidante pronunciado fue el flavonol quercetina, mientras las flavononas hesperitina y naringina ejercen un efecto más bajo (Yen *et al.*, 2003).

En microsomas de hígado de rata, el gossipol¹, la quercetina y la miricitina inhibieron poderosamente la peroxidación lipídica inducida por hierro en muy bajas concentraciones micromolares ($IC_{50} \leq 1.5 \mu M$). Sin embargo, los tres compuestos a una concentración 100 μM , mejoran la formación de radicales hidroxilo, arriba de ocho pares (Laughton *et al.*, 1989). Similarmente, los leucocitos humanos protectores contra daños oxidativos al DNA, inducidos por superóxidos por quercetina, fueron ambiguos. Las concentraciones incubadas de quercetina (1-50 μM) reducen los niveles de daño oxidativo al DNA, mientras a 100 μM la cantidad de daño aumenta. Estos resultados apoyados por los descubrimientos de la

¹El gossipol $C_{30}H_{30}O_8$ es un polifenol derivado de la planta del algodón. El gossipol es un aldehído polifenólico que permeabiliza las células y actúa como un inhibidor para varias de las enzimas deshidrogenasas. Es un pigmento amarillo.

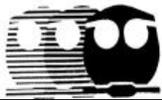


quercetina en solución con resonancia electrónica de spín (ESR), también muestran un efecto prooxidante a 100 μM (Will., 2008).

2.10.4.6. Oxidación por radicales fenoxilos de flavonoides

De acuerdo a la definición “clásica” de antioxidante, es una molécula que dona electrones o átomos de hidrógeno, proporcionando un radical que deriva de un antioxidante que es eficientemente estable por otro electrón o fuentes de hidrógeno para prevenir daño celular y cuyas propiedades están espacial y temporalmente relacionadas con eventos de estrés oxidante (Haliwell *et al.*, 1989; Cadenas *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2009).

Los productos finales de atrapamiento de ROS por flavonoides son los radicales fenoxil flavonoide (FI-O \cdot) con un tiempo de vida de 200 μs (Bayrakceken *et al.*, 2003). Hay fuertes reactivos y de oxidación más amplia, que proporcionan otros productos posibles, las quinonas más estables de los flavonoides. Las quinonas son flavonoides que pueden ser estabilizados por conjugación con nucleófilos, como GSH, cisteína o ácidos nucleicos (Awad *et al.*, 2002; Kanakis *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2009;). Esta reacción es responsable de uno de los efectos prooxidante de los flavonoides (McCord *et al.*, 1995; Pietta, 2000). Las propiedades prooxidantes de la apigenina, la narigenina y la naringina han sido descritas por mostrar sus radicales fenoxil, rápidos para oxidar NADH, resultando en una toma excesiva de oxígeno y la formación de O $_2$ \cdot^- (Galati *et al.*, 1999; Galati *et al.*, 2002). Otra reacción, que puede ser responsable por las propiedades prooxidantes no deseadas de los flavonoides, podría ser la interacción de FI-O \cdot .



con oxígeno en presencia de niveles altos de metales de transición (**Figura 14**), generando quinonas y $O_2^{\cdot-}$ (Pietta, 2000).

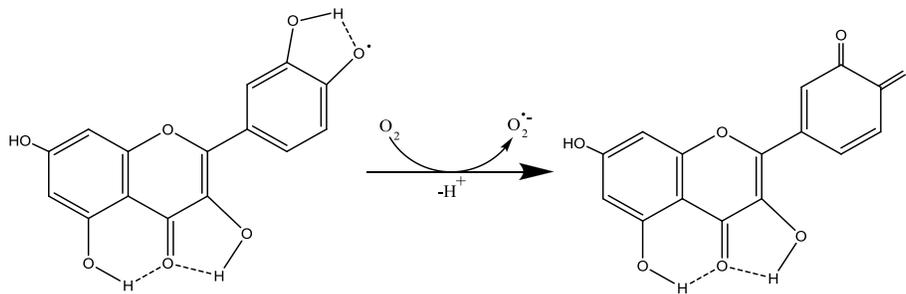
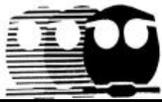


Figura 14. Actividad prooxidante de los flavonoides (Amic *et al.*, 2007).

Las fuentes de radicales del fenoxilo deberían ser también antioxidantes. Se ha encontrado que la rapidez de autoxidación para la quercetina y la miricetina es ampliamente dependiente al pH, con una autoxidación no detectada por la quercetina a pH fisiológico. La rapidez de autoxidación de la quercetina aumenta de forma importante por la adición de hierro y por la combinación de hierro seguido de SOD. La adición de hierro también aumenta la rapidez de autoxidación de la miricetina (Canada *et al.*, 1990). Por otro lado, ni el kaempferol (un flavonol monohidroxilado), ni la rutina (una quercetina glicosilada), han mostrado alguna habilidad a la autoxidación. La autoxidación de la quercetina acompañada por una rápida acumulación de H_2O_2 , se ha observado también en presencia de iones de cobre a pH neutro (El Hajji *et al.*, 2006).

2.10.4.7. Inhibición de la respiración mitocondrial

Algunos flavonoides son capaces de causar una combustión respiratoria insensible de cianuro, independiente del sustrato en mitocondrias aisladas y



experimentar autoxidación, que se le asocia a la producción de ROS (Hodnick *et al.*,1989; Hodnick *et al.*,1994). Además, se ha probado la habilidad de varios flavonoides (como la robinetina, ramnetina, eupatorina, baicaleína, norwogonina y 7,8-dihidroxyflavona) al inhibir succinoxidasa mitocondrial de corazón de res y NADH oxidasa. (Hodnick *et al.*,1994). Los flavonoides con tri-hidroxilos presentes (robinetina, bacaleína) o grupos *para*-dihidroxil (norwogonina) exhibieron una rapidez importante de autoxidación, que fue acelerado por la adición de cianuro. Los flavonoides que poseen una configuración de catecol (ramnetina, 7,8-dihidroxyflavona) exhibien una lenta rapidez de autoxidación en buffer, el cual se ha estimulado en presencia de cianuro.

Los flavonoles con grupo catecol en el anillo B (por ejemplo la quercetina y la fisetina) son capaces de producir *o*-semiquinonas y NADH oxidasas en diversos tipos de células de mamíferos. La quercetina y la fisetina causan disminución en de NADH y NAD⁺ mitocondrial en células hepáticas aisladas, con dosis dependientes, siendo que la reducción máxima, sea a 32.6 μM y 37.01 μM, respectivamente. Cambios en los valores de NADH y NAD⁺ se han visto acompañados por la reducción en ¹cetogénesis, estimulando el ciclo del ácido cítrico y desacoplando el efecto en la fosforilación oxidativa (probablemente causada por efecto del flavonoide en la respiración mitocondrial y la inhibición directa de ATP-sintetasa). Es más, en concentraciones bajas de quercetina (25 μM) estimulan la toma de oxígeno, mientras que en altas concentraciones (50-300 μM) inhiben la toma de oxígeno y estimulan además el ciclo del ácido cítrico. Ambos flavonoles son probablemente capaces de participar en la oxidación de

¹Cetogénesis: Es un proceso metabólico por el cual se producen los cuerpos cetónicos como resultado del catabolismo de los ácidos grasos | 59



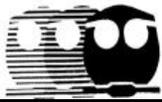
NADH (ambos en citosol y mitocondria) en células de mamíferos, cambiando las condiciones a un estado más oxidado (actividad prooxidante) (Buss *et al.*, 2005).

2.10.4.8. Oxidación por peroxidasas

Mecanismos alternativos para toxicidad prooxidante de los flavonoides involucra un cierto número de peroxidasas que catalizan la oxidación de polifenoles. Radicales fenoxil intracelulares (fenoles con ciclos redox) formados por mieloperoxidasas en neutrófilos también inducen la peroxidación lipídica y la co-oxidación de GSH al formar radicales tioles con activación de oxígeno al mismo tiempo (Goldman *et al.*, 1999; Galati *et al.*, 2002). Las propiedades prooxidantes de los flavonoides apigenina, naringenina y naringina han sido descritas y han mostrado que sus radicales fenoxil, co-oxidan rápidamente NADH, resultando en una extensa toma de oxígeno y la consecuencia de formar $O_2^{\cdot-}$ (Chan *et al.*, 1999; Galati *et al.*, 1999; Galati *et al.*, 2002).

2.10.4.9. Oxidación por antioxidantes de bajo peso molecular

Los flavonoides que contienen un anillo catecol (catecol, luteolina, eriodictiol y quercetina) se reportó que pueden oxidar al ascorbato, NADH o GSH. En general, se encontró su efectividad de catalizar la oxidación y aumentar, mientras su potencial redox disminuye. Así, los flavonoides más oxidables fueron los más efectivos. Esto está relacionado por el bajo potencial redox de los catecoles fueron más fácilmente oxidados por peroxidasa/ H_2O_2 , mientras los fenoles presentaron el mayor potencial redox (Galati *et al.*, 2007).



Sin embargo, los antioxidantes no actúan solos *in vivo*; los antioxidantes oxidados pueden ser reciclados en interacción con otros antioxidantes, tales como el ascorbato y el glutatión, llamadas conexiones antioxidantes (Bast *et al.*, 1991; Mesister *et al.*, 1994; Boots *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2008). Por ejemplo, el ascorbato puede regenerar Vitamina E oxidada y el GSH puede regenerar ascorbato oxidado dependiendo de los potenciales redox de estos antioxidantes.

Cuando los flavonoides comienzan a oxidar, una *o*-quinona se puede formar y ésta puede ser reciclada por GSH o por ascorbato, que comienzan a oxidar durante esta reacción, generando deshidroascorbato (Boots *et al.*, 2003). Tal mecanismo antioxidante sinérgico potencian las propiedades de atrapamiento de compuestos individuales (Dai *et al.*, 2008). La quercetina, la miricetina y el kaempferol indujeron una disminución dependiente de la concentración tanto de GSH contenido en el núcleo y la actividad de GST en un sistema modelo de núcleo aislado de células hepáticas de rata. La miricetina, que es el de máximo número de grupos hidroxil, es el más activo, en las pruebas de flavonoides. La pérdida de la defensa nuclear antioxidante GSH y GST por polifenoles en flavonoides puede deberse al daño oxidativo en DNA, que puede ser el principal responsable de su mutagenicidad (Sahu *et al.*, 1996).

Los flavonoides también pueden influir negativamente en la absorción de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular, por ejemplo, la absorción de luteolina puede ser afectado por la naringenina (Reboul *et al.*, 2007).



2.10.4.10. Daño directo al DNA

En la presencia de especies reactivas de nitrógeno, los flavonoides con pirogalol configurado en los anillos A o B inducen al rompimiento de las cadenas de DNA (Ohshima *et al.*, 1998). Se ha propuesto el mecanismo del sitio específico del daño al DNA causado por quercetina (Yamashita *et al.*, 1999). Este grupo catecol en el anillo A o B es oxidado por el ion Cu (II) enlazado al DNA, que puede generar ROS responsable por daños al DNA. En contraste, el kaempferol y la luteolina inducen un pequeño daño al DNA, incluso en presencia de Cu (II). El Amrani y sus colegas, estudiaron la oxidación del DNA inducido por el complejo formado entre flavonoide y Fe (III) (Amic *et al.*, 2007). El mecanismo propuesto del complejo Fe (II)-flavonoide, que se enlaza al DNA y genera ROS, es presentada en la **Figura 15**.

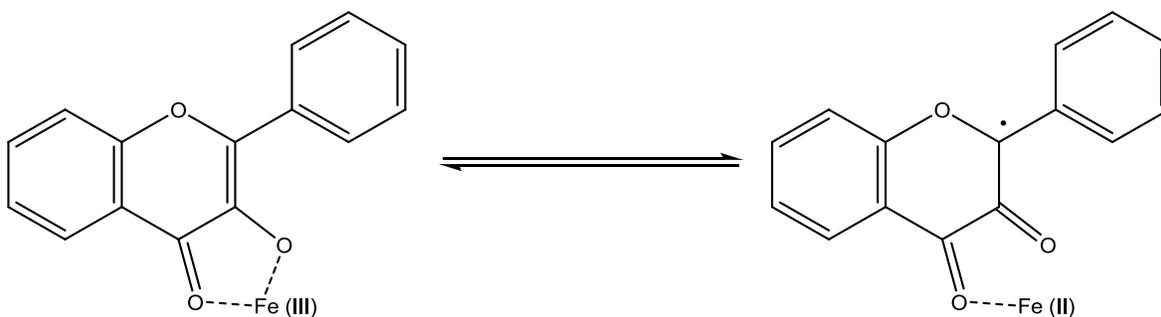
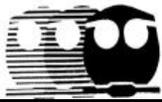


Figura 15. Ruta propuesta para la generación del complejo Fe (II)-flavonoide a partir del complejo Fe (III)-flavonoide (Amic *et al.*, 2007).

2.11. Compuestos fenólicos

El interés por los compuestos fenólicos o polifenólicos como beneficio para la salud se ha incrementado debido a que se han observado potentes actividades



antioxidantes y atrapadores de radicales libres en estudio *in vitro*. Sin embargo, su papel *in vivo* aún no está muy claro ya que, su aparición en plantas como una mezcla compleja de compuestos polifenólicos crea grandes dificultades en el análisis de la biodisponibilidad y de sus efectos nutricionales y fisiológicos (Procházkova *et al.*, 2011).

Se origina principalmente en las plantas que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario por lo que se pueden encontrar en una gran variedad de plantas comestibles: frutos, hortalizas, bebidas (como té, café, cerveza, vino tinto), en el aceite de oliva, en cereales y en algunas semillas. El aporte de polifenoles en la dieta es de 50 a 800 mg por día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen. Un nivel importante de antioxidantes, se alcanza cuando el consumo es de unos 800 mg/día, que puede lograrse con una dieta rica en frutas y hortalizas (Estrella, 2007).

Algunos polifenoles son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones en defensa antes situaciones de estrés y estímulos diversos. La biosíntesis de polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: La ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Quiñones *et al.*, 2012).

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8,000 compuestos diversos. Químicamente son sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se pueden clasificar



en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen a los anillos (Manach *et al.*, 2004).

2.11.1 Compuestos fenólicos simples

Son básicamente fenoles sustituidos. El patrón de sustitución del anillo bencénico por grupos –OH se encuentren en posición 1,2-, 1,3-, 1,4-. Con tres sustituyentes, el patrón de sustitución puede ser 1,3,5-, la cual si se trata de tres sustituyentes idénticos *meta*-tri-sustitución. Como ejemplo se tiene el catecol y el floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno). **Cuadro 4** (Vermerris *et al.*, 2006).

2.11.2. Ácidos fenólicos y aldehídos

Los ácidos hidroxibenzóicos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo sustituido en un fenol. Como ejemplo están el ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido protocatequico, ácido salicílico y ácido vainílico. **Cuadro 4** (Vermerris *et al.*, 2006).

2.11.3. Acetofenonas y ácido fenilacéticos

Las fenonas son compuestos C₆-C₂ que raramente se encuentran en la naturaleza. Ejemplos de estos compuestos incluyen a 2-hidroxiacetofenona y ácido 2-hidroxifenil acético. **Cuadro 4** (Vermerris *et al.*, 2006).



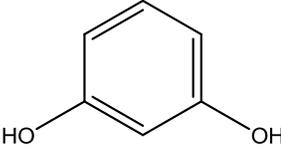
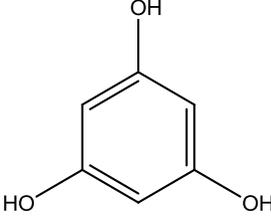
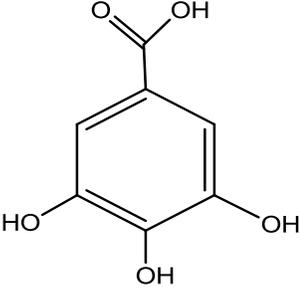
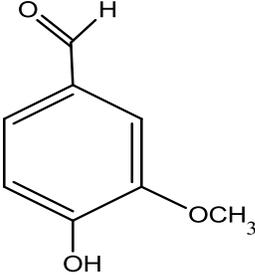
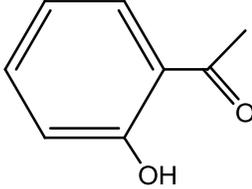
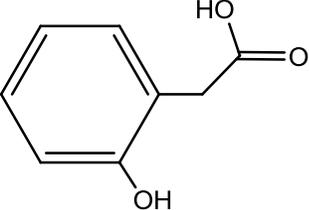
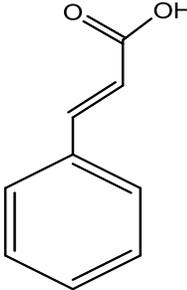
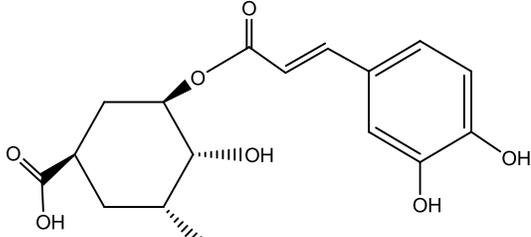
2.11.4. Ácidos cinámicos

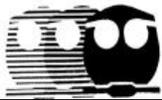
Hay seis tipos comunes de ácidos cinámicos, los cuales comparten un esqueleto C_6-C_2 . Todas las plantas contienen al menos tres de estos compuestos. Como ejemplo están el ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeíco, ácido ferúlico y ácido sinápico. Los ácidos cinámicos se encuentran con frecuencia en las plantas como ésteres del ácido quínico, ácido siquímico y ácido tartárico. Por ejemplo el ácido clorogénico es el éster del ácido cafeíco. **Cuadro 4** (Vermerris *et al.*, 2006).

2.11.5. Cumarinas

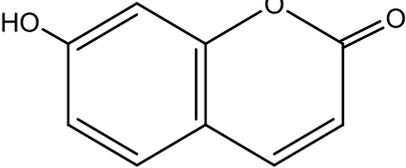
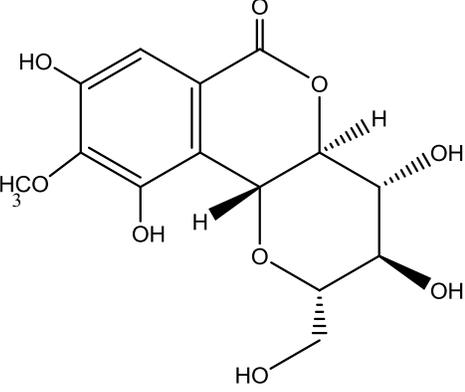
Las cumarinas también poseen un esqueleto C_6-C_3 , pero posee un oxígeno heterocíclico como parte de la unidad C_3 . Estos compuestos tienen en común una estructura *2H-1* benzopiran-2-ona, denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumárico, se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química dando lugar a diversos derivados. Prácticamente todas las cumarinas, poseen un sustituyente hidroxílico, en posición 7 ya sea libre o combinado. Muchas cumarinas juegan un papel importante en la resistencia a enfermedades pestes, así como en la tolerancia a la radiación UV. **Cuadro 4** (Vermerris *et al.*, 2006).

**Cuadro 4.** Ejemplo de algunos compuestos fenólicos (Vermerris *et al.*, 2006).

Clase	Ejemplos	
Fenólicos simples	 <p data-bbox="581 600 732 632">Resorcinol</p>	 <p data-bbox="1068 600 1252 632">Floroglucinol</p>
Ácidos fenólicos y aldehídos	 <p data-bbox="570 1003 745 1035">Ácido gálico</p>	 <p data-bbox="1094 993 1226 1024">Vainillina</p>
Acetofenonas y ácidos fenilacéticos	 <p data-bbox="508 1381 802 1413">2-hidroxiacetofenona</p>	 <p data-bbox="971 1409 1354 1440">Ácido 2-hidroxifenil acético</p>
Ácidos cinámicos	 <p data-bbox="561 1812 748 1843">Ácido ferúlico</p>	 <p data-bbox="1032 1818 1289 1850">Ácido clorogénico</p>



Cuadro 4 (continuación). Ejemplo de algunos compuestos fenólicos (Vermeris *et al.*, 2006).

Cumarinas	 <p>Umbeliferona</p>	 <p>Bergenina</p>
-----------	---	---

2.11.6. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos que pertenecen al grupo de los polifenoles, además de su actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como la actividad cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectiva, antineoplásica, antimicrobial entre otras (Procházkova *et al.*, 2011).

En la naturaleza, las plantas son la única fuente de flavonoides y se les puede encontrar en frutas, verduras, semillas, cereales y en algunos productos manufacturados como la cerveza, el té y el vino (Iglesias, 2009).



De la forma general, el anillo A deriva de la ruta de acetato-mevalonato y el anillo B proviene de la fenilalanina. Por último, el heterociclo se nombra anillo C. **Figura 16.** (Iglesias, 2009).

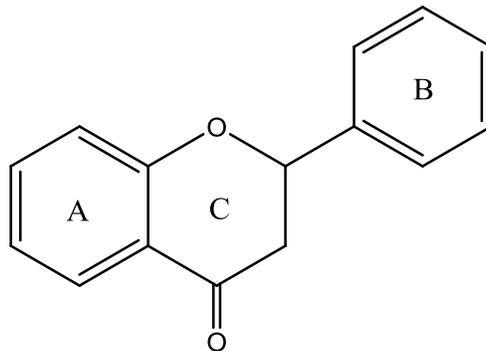


Figura 16. Estructura básica de los flavonoides. (Modificado de Vermerris, 2006).

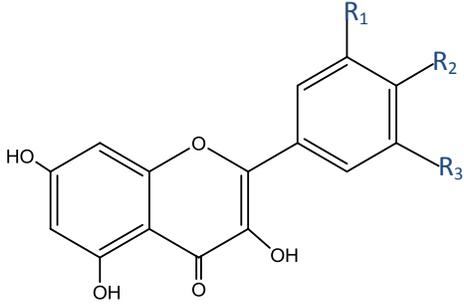
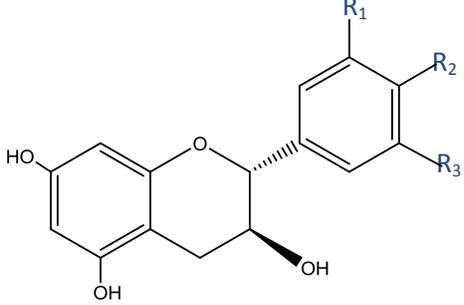
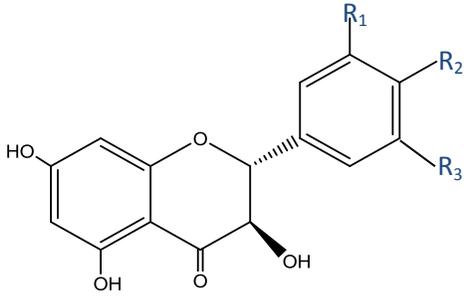
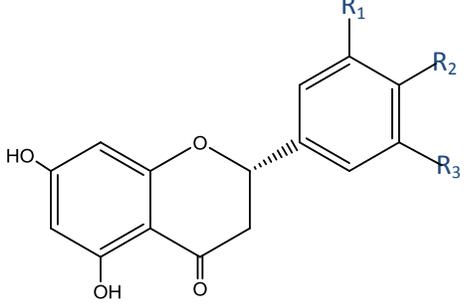
A partir de sus variaciones estructurales, los flavonoides se clasifican en 13 subgrupos. Dentro de los flavonoides, se encuentran y sobresalen flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavononas y antocianidinas, ilustrados en la **Cuadro 5.** (Pérez *et al.*, 2001).

Cuadro 5. Clasificación y estructura general de algunos flavonoides (Pérez *et al.*, 2001).

Subclase	Estructura base	Ejemplos	Fuente natural	Bibliografía
Flavona		Apigenina R ₁ :OH, R ₂ :H, R ₃ :H Diosmina R ₁ :OH, R ₂ :OCH ₃ , R ₃ :H Luteolina R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :H	Apio Pimentón Uva Naranja Limón	Drago, 2007. Ochoa, 2004. Manach <i>et al.</i> , 2004. Vermerris, 2006.



Cuadro 5 (continuación). Clasificación y estructura general de algunos flavonoides (Pérez *et al.*, 2001).

<p>Flavonol</p>		<p>Quercetina R₁:OH, R₂:OH, R₃:H</p> <p>Miricetina R₁:OH, R₂:OH, R₃:OH</p> <p>Kaempferol R₁:H, R₂:OH, R₃:H</p>	<p>Cebolla Vino Tomate Naranja Manzana Frutas rojas</p>	<p>Drago, 2007. Martínez <i>et al.</i>, 2002. Manach <i>et al.</i>, 2004. Vermeris, 2006.</p>
<p>Flavanol</p>		<p>Catequina R₁:OH, R₂:OH, R₃:H</p> <p>Epicatequina R₁:OH, R₂:OH, R₃:H</p> <p>Galocatequina R₁:OH, R₂:OH, R₃:OH</p>	<p>Vino Cocoa Té Uva</p>	<p>Drago, 2007. Manach <i>et al.</i>, 2004. Vermeris, 2006.</p>
<p>Dihidroflavonol o flavonoide</p>		<p>Aromadetrina R₁:H, R₂:OH, R₃:H</p> <p>Taxifolina R₁:H, R₂:OH, R₃:OH</p> <p>Fustina R₁:OH, R₂:OH, R₃:H</p>	<p>Vino</p>	<p>Hidalgo, 2003. Vermeris, 2006.</p>
<p>Flavanona</p>		<p>Hesperidina R₁:OH, R₂:OCH₃, R₃:H</p> <p>Naringerina R₁:OH, R₂:H, R₃:H</p>	<p>Tomate Cítricos Miel Lúpulo</p>	<p>Drago, 2007. Manach <i>et al.</i>, 2004. Vermeris, 2006.</p>



Cuadro 5 (continuación). Clasificación y estructura general de algunos flavonoides (Pérez *et al.*, 2001).

Subclase	Estructura base	Ejemplos	Fuente natural	Bibliografía
Antocianidina		Malvidina Pelargonidina Delfidina Peonidina	Frutas rojas Pera Uva Naranja	Drago, 2007. Manach <i>et al.</i> , 2004. Vermerris, 2006.
Isoflavonoide		Genisteína R ₁ :OH, R ₂ :H Daidzeína R ₁ :H, R ₂ :H Gliciteína R ₁ :H, R ₂ :OCH ₃	Soya Leguminosas	Drago, 2007. Martínez <i>et al.</i> , 2002. Manach <i>et al.</i> , 2004. Vermerris, 2006.
Biflavonide		Amentoflavona Bilobetina Ginkgetina Isoginkgetina	<i>Ginkgo biloba</i>	Osorio <i>et al.</i> , 2009.
Tanino condensado o proantocianidina		Granatina Punitina Punicalina Tercatania Tergalagina Terflavina	Corteza de pino Ciprés Semillas de uva	Martínez <i>et al.</i> , 2002.



Cuadro 5 (continuación). Clasificación y estructura general de algunos flavonoides (Pérez *et al.*, 2001).

Subclase	Estructura base	Ejemplos	Fuente natural	Bibliografía
Tanino hidrolizable		Galotaninos	Rosa Roble Eucalipto	Hidalgo, 2003.

2.12. Medición de la cantidad de compuestos fenólicos

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu (Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.12.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu

El método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando de esta manera complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).



Figura 17. Reacción en el ensayo de Folin-Ciocalteu

2.12.2. Ensayo de flavonoides totales

El método es colorimétrico y se basa en el principio de que el AlCl_3 forma complejos de ácidos estables con el grupo ceto en el carbono 4 y en los grupos hidroxilos en los carbonos 3 y 5 de las flavonas y flavonoles. Al unirse el AlCl_3 forma complejos de ácidos lábiles con los grupos orto-dihidroxilos de los anillos A o B de los flavonoides. Los complejos formados presentan una máxima absorción a una longitud de onda de 415 nm (Chang *et al.*, 2002).

2.12.3. Ensayo de la vainillina

Es generalmente conocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, puede tener interferencias debido a dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 μg con precisión y exactitud de 1 μg . El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza. La estabilidad del color del aducto de la vainillina-tanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de la reacción es controlada. **Figura 18.** (Sarkar *et al.*, 1976).

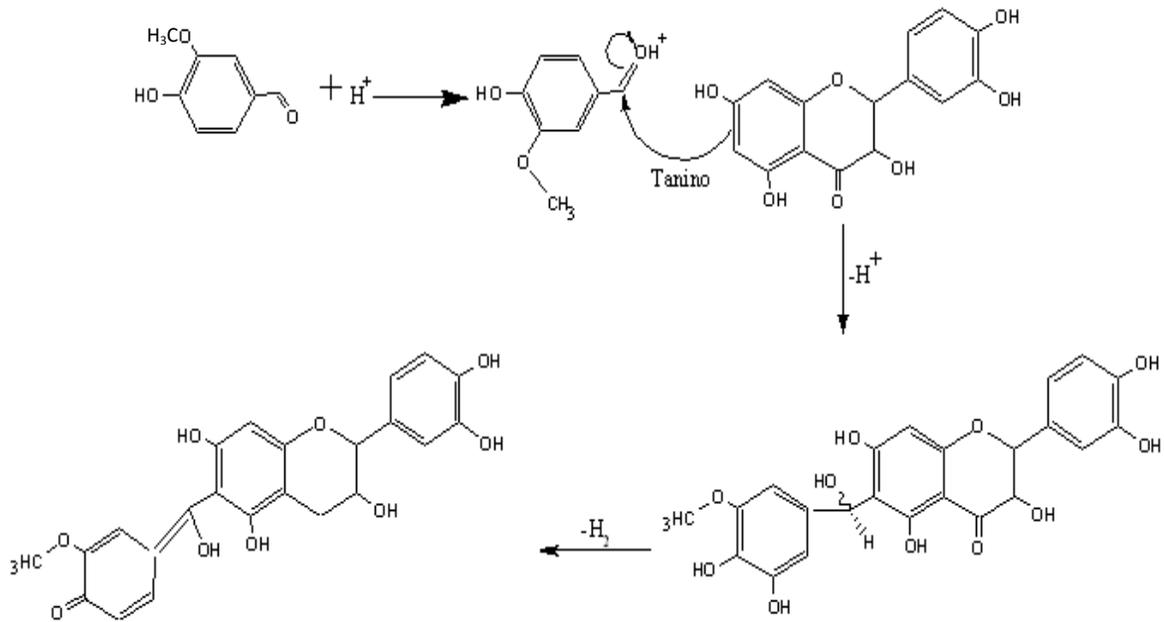
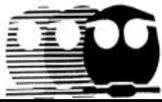


Figura 18. Reacción de identificación de flavonoides por medio de vainillina sulfúrica. Modificado de Martínez, *et al.*, 2007.

2.13. Medición de la capacidad antioxidante

En la literatura se han publicado varios ensayos para determinar la actividad antioxidante, así como los mecanismos de los antioxidantes sobre ROS, que se encuentran bien documentados. Principalmente hay dos tipos de pruebas para antioxidantes: el método químico que involucra el uso de instrumentos analítico (como espectrofotómetros, CG y CLAE) y el método que implica un ensayo biológico (como ELISA) (Moon *et al.*, 2009).



2.13.1. Ensayos asociados con la transferencia de electrones y radicales

2.13.1.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

El DPPH \cdot es uno de los pocos radicales orgánicos estables de nitrógeno se comercializan en el mercado. El método se basa en la teoría de que un antioxidante es un donador de hidrógenos. El efecto antioxidante es proporcional al desaparición de DPPH \cdot en la muestra. Se mide la desaparición del radical DPPH del medio de reacción por medio de espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR), RMN y UV. **Figura 19.** (Moon *et al.*, 2009).

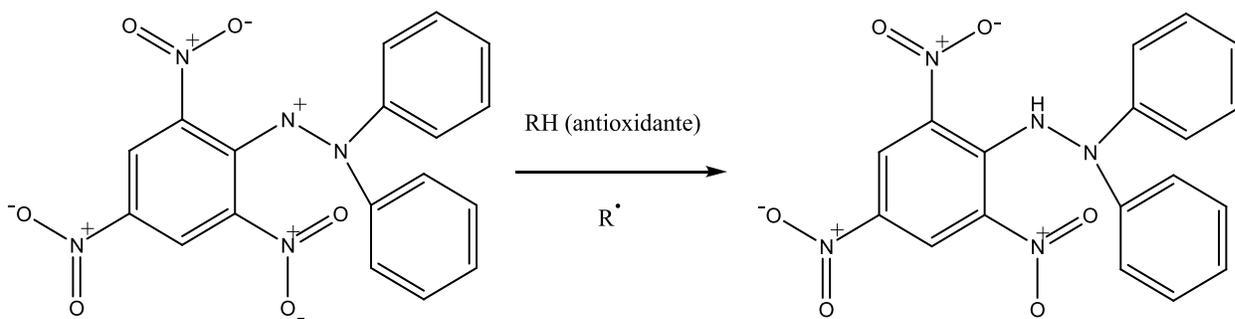


Figura 19. Reacción entre DPPH \cdot y la molécula antioxidante (Moon *et al.*, 2009).

2.13.1.2. Ensayo del 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS).

Se ha usado de forma amplia debido a que puede realizarse tanto en fase acuosa como en fase lipídica. Originalmente el método se basaba en la activación de la metahemoglobina por H $_2$ O $_2$ en presencia del ABTS. Actualmente se emplea el radical catiónico de ABTS que es estable, de una coloración azul-verde, producido a partir de la oxidación de ABTS por K $_2$ S $_2$ O $_8$. La actividad antioxidante de carotenoides, compuestos fenólicos y algunos componentes del plasma se



determina por la decoloración de $\text{ABTS}^{\cdot+}$, mediante un espectrofotómetro a 734 nm. **Figura 20.** (Moon *et al.*, 2009).

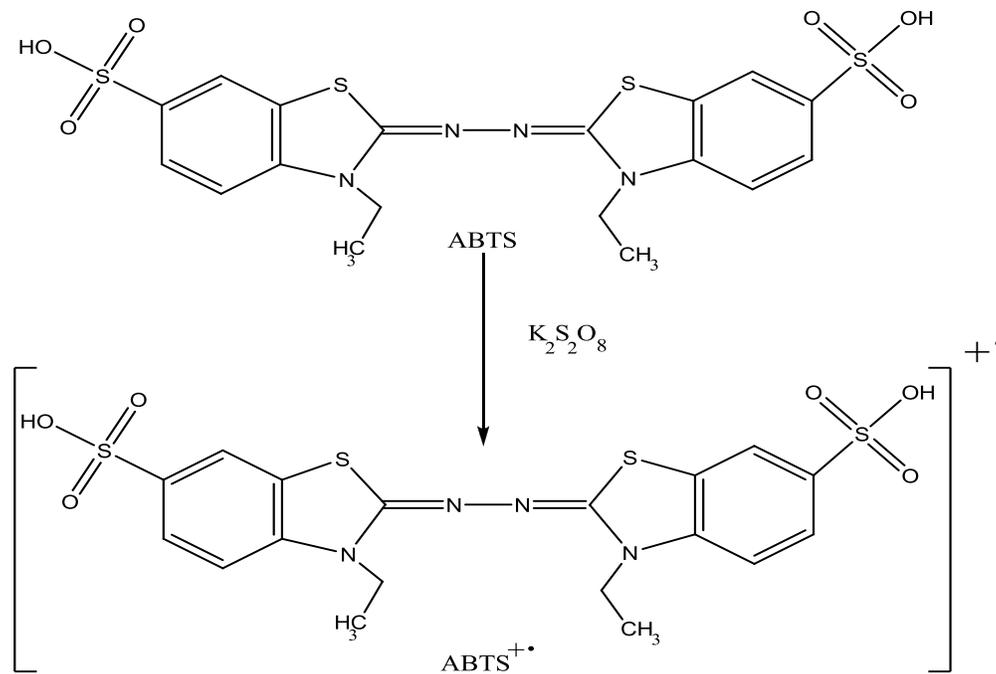


Figura 20. Formación del radical catiónico de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ con persulfato de sodio. (Moon *et al.*, 2009).

2.13.1.3. Ensayo del Poder Antioxidante/Reductor de hierro (FRAP)

Se produce el complejo Fe^{3+} - 2,4,6,-tripiridil-S-triazina (TPTZ) que puede ser reducido a la forma Fe^{2+} por un antioxidante, bajo condiciones ácidas. Se observa la aparición de un color azul intenso cuya absorción se mide a 593 nm. **Figura 21.** (Moon *et al.*, 2009).

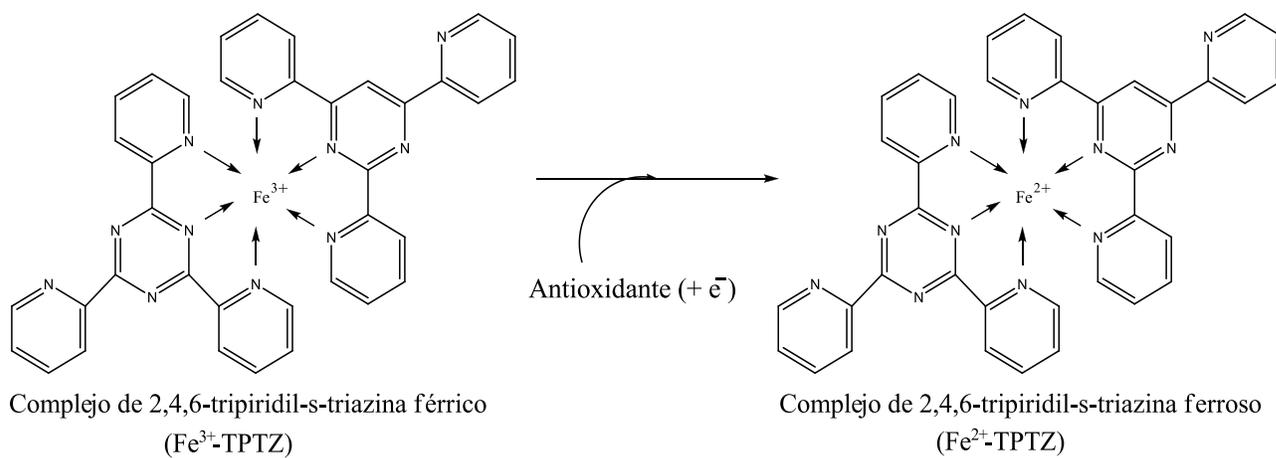
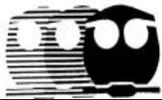


Figura 21. Formación del complejo (Fe^{2+} -TPTZ) a partir de (Fe^{3+} -TPTZ). (Moon *et al.*, 2009).



3. JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional se ha convertido en un tema de importancia mundial, en implicaciones tanto medicinales como económicas. Un uso generalizado y regular de plantas y hierbas por todo el mundo ha aumentado el interés de forma seria en todo lo que se refiere a su eficacia, calidad y seguridad. Así mismo, ha comenzado la búsqueda de una evidencia científica adecuada y/o la evaluación de la medicina tradicional, para tener criterios de aceptación acerca de las afirmaciones de la misma. Las plantas del género *Crataegus*, de la familia Rosaceae, son ampliamente distribuidas y enormemente usadas por la medicina popular para tratamientos de varias enfermedades, tales como las relacionadas al corazón (enfermedades cardiovasculares), al sistema nervioso central, al sistema inmune, al sistema reproductivo, padecimientos relacionadas a órganos como el hígado, riñones, ojos, etc. Con esto se ha demostrado que estas plantas poseen un amplio rango contra daños citotóxicos, que tienen propiedades gastroproctéticas, antiinflamatorias, anti-HIV y actividades antimicrobianas. Fitoquímicos como procianidinas oligoméricas, flavonoides, triterpenos, polisacáridos, catecolaminas han sido identificadas en el género *Crataegus* y muchas de éstas se han evaluado para su actividad biológica, sin embargo se conoce muy poco o casi nada del género *Crataegus mexicana* y que en nuestro país abunda en demasía.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), las enfermedades cardiacas, son las primeras causas de muerte en México. Debido a que en México no existe una cultura general en la población por mantener un peso corporal adecuado y saludable, una disciplina para evitar el consumo de alcohol y/o tabaco,



un control de la presión arterial, formas de evitar el estrés, una alimentación saludable y el hábito de realizar ejercicios físicos, ocurre que se desarrollan enfermedades cardiovasculares, que no siempre son por genética y herencia, como la hipertensión arterial, las dislipidemias, la obesidad y cuadros diversos de diabetes, entre otros (INSP, 2010).

Basados en un estudio realizado en 2010 por el INSP, el 68.5 % de los mexicanos tiene problemas de obesidad y sobre peso, el 58.0% padece diabetes, un 21.0% sufre de dislipidemias y otro 43.5% presión arterial, padecimientos que en los últimos 13 años han crecido un 22.0%. La mayoría de los decesos ocurren por cardiopatías isquémicas, un padecimiento que es ocasionada por la arteriosclerosis de las coronarias, encargadas de bombear sangre al miocardio y por lo tanto, es considerada la más letal, ya que afecta comúnmente a personas mayores de 40 años y con más frecuencia a los hombres, en un 65% (INSP, 2010).

Así mismo, se sabe de las altas concentraciones de flavonoides que hay en diversas especies del género *Crataegus* en sus respectivos frutos y de la contribución de estos compuestos al bienestar físico de las personas que lo consumen, entre los que destacan su efecto cardioprotectivo (Chang *et al.*, 2002). No obstante, jamás se ha realizado un estudio de flavonoides en los frutos del género *Crataegus mexicana*, sin embargo, si se sabe de los beneficios que contribuye el consumo del tejocote, por simple experiencia y creencia popular en México. El presente trabajo posee la finalidad de caracterizar y cuantificar los



flavonoides presentes en los frutos denominados popularmente como tejocotes y realizar una evaluación de la capacidad antioxidante del extracto del mismo.



4. OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Determinar y cuantificar la cantidad de flavonoides totales presentes en el extracto del fruto de *Crataegus mexicana*, conocido como tejocote.
2. Caracterizar los flavonoides previamente purificados, por medio de Resonancia Magnética Nuclear.
3. Realizar la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto.

Objetivos particulares

1. Preparar el extracto metanólico de los frutos frescos de tejocote utilizando la técnica de maceración.
2. Realizar el fraccionamiento del extracto metanólico por métodos cromatográficos convencionales.
3. Aislar y purificar los compuestos flavonoides a partir de fracciones primarias.
4. Determinar y cuantificar el contenido de flavonoides y de fenoles totales presentes en el extracto.
5. Caracterizar los flavonoides previamente purificados, por medio de Resonancia Magnética Nuclear.
6. Realizar la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto por los métodos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.



5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Métodos generales de análisis

5.1.1. Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía en capa fina (ccf) se llevaron a cabo de acuerdo a técnicas convencionales, apoyado en una variedad de sistemas de elución y el uso de placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales se encontraban recubiertas en gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck) de 0.25 mm de espesor. Las cromatoplasas se visualizaron con luz UV (con onda corta a 254 nm y con onda larga a 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con un agente cromógeno (vainillina sulfúrica 1%), sometida a un calentamiento posterior hasta la total visualización de los compuestos.

La cromatografía en columna, se realizó en 2 columnas diferentes: una sobre una resina de intercambio iónico Amberlita XAD-16, con dimensiones en la columna de 80 cm de largo por 13.5 cm de diámetro y como fase móvil agua y metanol. Mientras la otra columna fue abierta con mediana presión con un sistema en fase reversa, empacada con resina sílica gel y con dimensiones de 50 cm de largo por 7.5 cm de diámetro.

5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas

La resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹-H) se realizó en un aparato Unity—Inova, operado a una radiofrecuencia de 400 MHz. El disolvente utilizado para la disolución de los compuestos fue CH₃OH-*d*₄ o DMSO-*d*₆.



5.2. Material vegetal

El material vegetal de estudio utilizado, que fue el fruto tejocote, se recolectó en el poblado de Polotitlán, en el Estado de México y una muestra de referencia se conserva en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia del Conjunto E de la Facultad de Química.

5.3. Tratamiento previo del material vegetal

Los frutos recolectados se limpiaron del material extraño que contenían (hojas, varas, tierra, etc.).

5.4. Estudio fitoquímico del fruto de *Crataegus mexicana* (tejocote).

5.4.1. Obtención del extracto metanólico

Dos kilogramos del fruto fresco del tejocote se colocaron en un macerador de vidrio con 4L de metanol y se mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de 7 días. El material vegetal se separó por filtración y el extracto obtenido se concentró a presión reducida hasta obtener un residuo sólido.

5.4.2. Fraccionamiento primario del extracto metanólico

Se pesó una porción de 108.38 g del extracto metanólico seco en un vaso de precipitados y posteriormente se le adicionaron 500 mL de H₂O desionizada para disolver el extracto y posteriormente se trató con la resina Amberlita XAD-16 y la suspensión se agitó durante dos horas a 200 rpm. A continuación, la resina se empacó en una columna para cromatografía al vacío (VLC) y se realizó el proceso



de elución con un gradiente de agua 100% hasta metanol 100%. Todas las fracciones recolectadas se compararon utilizando ccf y como sistema de elución una mezcla de AcOEt/H₃CCOOH/HCOOH/H₂O (15:0.4:0.6:4). Los compuestos de interés se obtuvieron con una mezcla de 1:1 (MeOH-H₂O) y se obtuvieron 30 fracciones en total, siendo las fracciones con similitud, las fracciones 10 (FX) hasta la fracción 20 (FXX). Se juntaron todas las fracciones similares para tener una sola y se evaporó el disolvente, hasta obtener la fracción seca. Se pesó en una balanza analítica (342.8 mg).

5.4.3. Fraccionamiento secundario del extracto metanólico

Se pesó 208.0 mg de las fracciones similares secas obtenidas en el primer fraccionamiento en un vaso de precipitados y posteriormente se le adicionaron 10 mL de MeOH hasta la disolución del extracto para que fuese absorbido por la resina a través de una agitación. La fase móvil de la cromatografía en columna fue una mezcla de MeOH-H₂O (3:7), donde primero se le depositó 500 mL de la mezcla a la columna y después se le adicionó la mezcla de las fracciones con el MeOH. Se continuó la desorción de la resina con mezclas de MeOH-H₂O (3:7) donde se obtuvieron un total de 15 fracciones y se compararon por medio de ccf. Se utilizó un sistema de elución de AcOEt/H₃CCOOH/HCOOH/H₂O (15:0.4:0.6:4) para las cromotoplasmas y se reveló con vainillina sulfúrica al 1% como agente cromógeno. Las fracciones con similitud fueron las fracciones 3 y 4 (F2III y F2IV) por un compuesto, las fracciones 10, 11 y 12 (F2X, F2XI, F2XII) por otro compuesto y las fracciones 13 y 14 (F2XIII y F2XIV) por otro diferente. Se juntaron



las fracciones con similitud y se evaporó el disolvente, hasta llevar a sequedad. Se pesaron las fracciones similares (33 mg, 1.8 mg y 1.2 mg).

5.4.4. Obtención e identificación de los flavonoides (-)-epicatequina, kaempferol y quercetina.

Las fracciones F2III y F2IV se identificaron a través de ccf por comparación de un estándar de la (-)-epicatequina. Misma que se purificó y posteriormente se identificó como tal por medio de RMN¹-H por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con los descritos en la literatura para la (-)-epicatequina (Davis *et al.*, 1996). El mismo procedimiento se llevó a cabo con los flavonoides minoritarios kaempferol y quercetina. En el **Diagrama 1** se muestra un resumen del proceso de la obtención del extracto y posterior fraccionamiento.

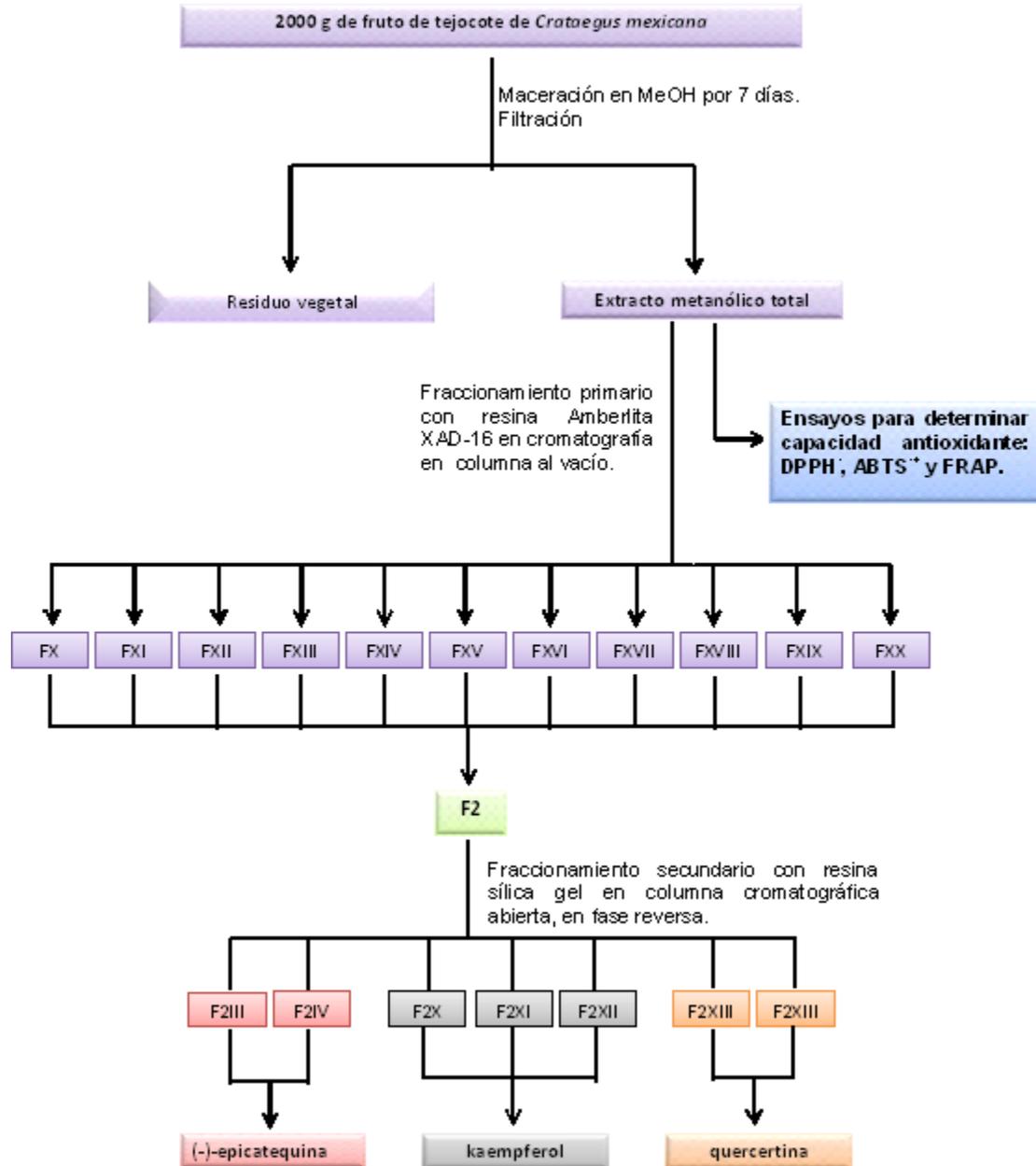
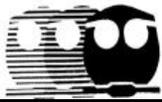


Diagrama 1. Proceso de la obtención y fraccionamiento del extracto metanólico del fruto del tejocote del género *Crataegus mexicana*.



5.5. Determinación del contenido de antioxidantes

5.5.1. Determinación de fenoles totales

Se utilizó la metodología descrita por Singleton y colaboradores (1965). Se agregó 160 μL de agua desionizada, 20 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1) y 20 μL de la disolución de la muestra del extracto total (1.0 mg/mL), por triplicado y se reposó por 8 minutos en la oscuridad. Finalmente se adicionaron 10 μL de Na_2CO_3 al 20% y se guardó la mezcla de reacción en la oscuridad por 1 hora, por último, se realizó una lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Cabe resaltar, que los pozos en las placas son para 200 μL , sin embargo, los 10 μL adicionados al final del ensayo, entran perfectamente en el pozo, con los reactivos previamente adicionados.

5.5.2. Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo la metodología de Kumazawa y colaboradores (2004). Se adicionaron 100 μL de solución etanólica de AlCl_3 al 2% y 100 μL de solución del extracto al 1.0 mg/mL. Se dejó incubar a temperatura ambiente una hora y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de ELISA BIO-RAD Benchmark. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.



5.6. Ensayos de capacidad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por medio de la capacidad de neutralización del radical DPPH, del catión ABTS y el ensayo de FRAP.

5.6.1. Determinación de la actividad inhibitoria del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·)

Se utilizó la capacidad de atrapamiento del radical DPPH· para determinar la actividad antioxidante de las muestras, siguiendo la metodología descrita por Rojano y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. La determinación se realizó en placas de 96 pozos. Se colocaron 100 μ L de solución de la muestra (1.0 mg/mL) y se adicionaron 100 μ L de solución etanólica de DPPH· 0.208 mM. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA BIO·RAD Benchmark. Cada muestra se ensayó pro triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

5.6.2. Determinación de la actividad atrapadora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS^{•+})

De acuerdo al método descrito por Kriengsak y colaboradores (2006) con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se formó por la reacción de oxidación de 7mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio. La solución resultante se conservó durante 16 horas en ausencia de luz antes de su utilización. De esta forma la actividad antioxidante de las muestras, se evaluó con la capacidad de atrapamiento del radical ABTS^{•+}. La solución del radical ABTS^{•+} se



diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia inicial de al menos 0.70 a una longitud de onda de 700 nm.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, se adicionaron 20 μL de solución de cada muestra (1.0 mg/mL) y se colocaron 180 μL de la solución del radical ABTS^{•+} ajustados a la absorbancia de al menos 0.70. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 6 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de ELISA BIO·RAD Benchmark.

Cada muestra se ensayó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

5.6.3. Determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP).

El ensayo de FRAP se efectuó utilizando la metodología descrita por Strain (1996) con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos, se colocó en cada pozo 20 μL de solución de la muestra (0.01 mg/mL) con 180 μL de solución del reactivo de FRAP (2.5 mL de solución 2,4,6-tripiridil-S-triazina 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de FeCl_3 20 mM y 25 mL de buffer de acetato 300 mM a un pH de 3.6). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA BIO·RAD Benchmark.

Cada muestra se ensayó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.



6. RESULTADOS

6.1. Determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales

6.1.1. Determinación de flavonoides totales

Para poder determinar la concentración de flavonoides totales, se elaboró una curva patrón de quercetina ($r=0.9959$), en donde los resultados se expresan en mg equivalentes de quercetina y son presentados en el **Cuadro 6**.

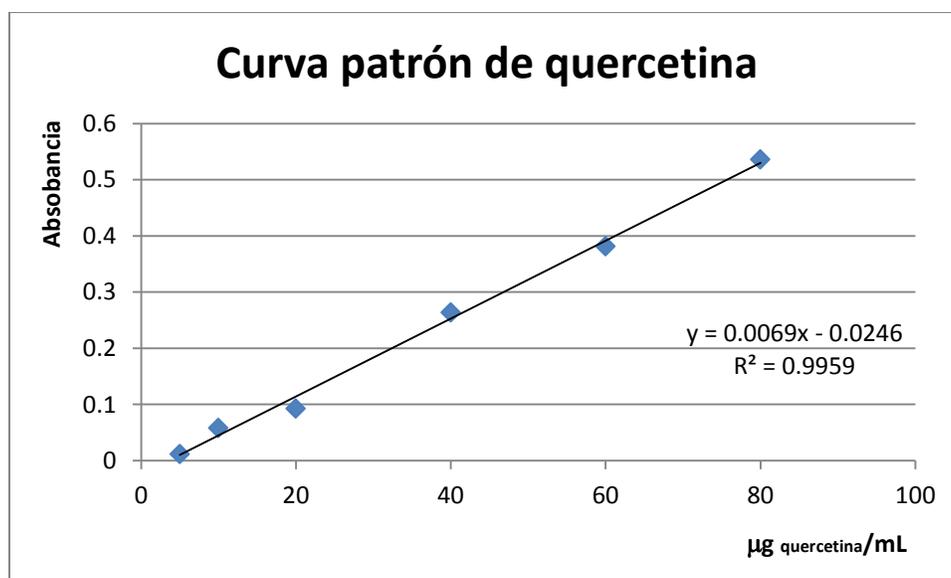


Figura 22. Curva patrón de quercetina para la determinación de flavonoides totales en las muestras de prueba.

6.1.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para calcular la concentración de fenoles totales, se elaboró una curva patrón de ácido gálico ($r=0.9900$), en donde los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico y son presentados en el **Cuadro 6**.

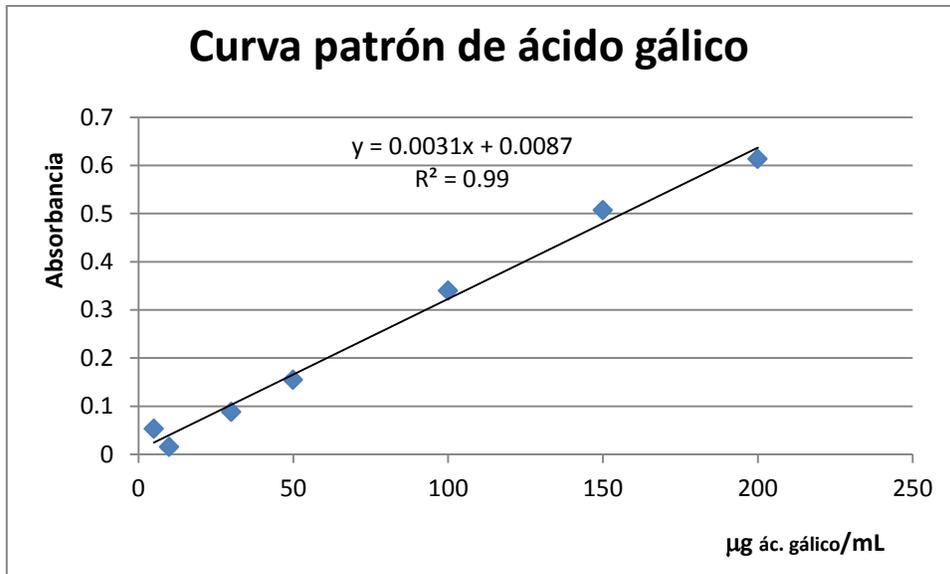
**a****b**

Figura 23. (a) Curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales en las muestras de prueba. **(b)** Coloraciones en la determinación de fenoles totales. Tubo de ensayo de la izquierda: Control negativo, tubo de ensayo de la derecha: Muestra del extracto metanólico.

Cuadro 6. Determinación de cantidad de flavonoides y fenoles totales expresados como miligramos equivalentes de quercetina por cada 100 gramos de extracto y miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de extracto, respectivamente. Se utilizaron 3 concentraciones diferentes del extracto metanólico (1.0, 0.5 y 0.1 mg/mL). Se reporta el promedio de tres determinaciones.

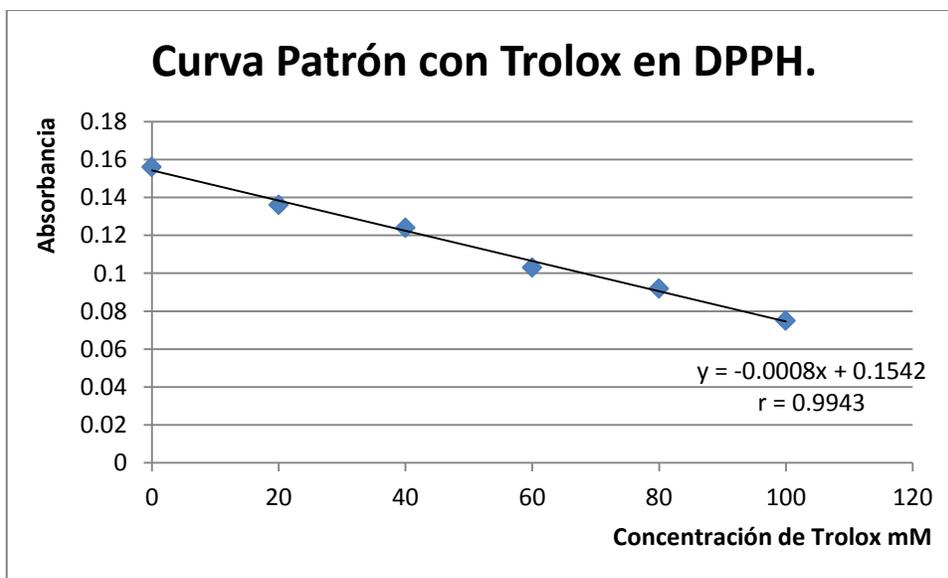
g extracto	Flavonoides totales	Fenoles totales
	(mg equivalentes de quercetina)	(mg equivalentes de ácido gálico)
100	20.01	52.59



6.2. Ensayos de capacidad antioxidante

6.2.1. Ensayo de la actividad inhibitoria del DPPH.

Para calcular la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), mediante el ensayo de la actividad inhibitoria del DPPH se construyó una curva patrón con Trolox ($r=0.9943$), en donde los resultados se expresan en mg equivalentes a Trolox y son presentados en el **Cuadro 7**.



(a)

(b)

Figura 24. (a) Curva patrón de Trolox® el ensayo de DPPH. (b) coloraciones obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto.

6.2.2. Ensayo de la actividad inhibidora del radical ABTS^{•+}

Para calcular la capacidad antioxidante equivalente a Trolox® (TEAC), mediante el ensayo de la actividad inhibitoria del radical ABTS^{•+} se construyó una curva patrón con Trolox ($r=0.9943$), en donde los resultados se expresan en mg equivalentes a Trolox y son presentados en el **Cuadro 7**.

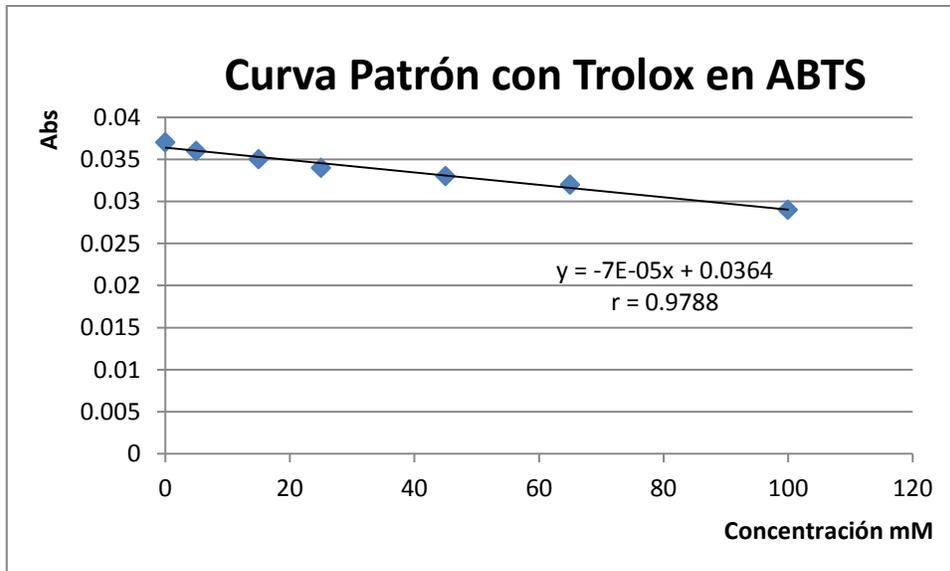


Figura 25. (a) Curva patrón de Trolox® para el ensayo de ABTS⁺, **(b)** coloraciones obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto.

6.2.3 Ensayo de la capacidad reductora de hierro (FRAP).

Para esta determinación se prepararon dos curvas patrón de los antioxidantes de referencia en medio acuoso, una de ácido ascórbico ($r=0.9945$) representada en la **Figura 26** y otra de Trolox® ($r=0.9980$), en la **Figura 27**.

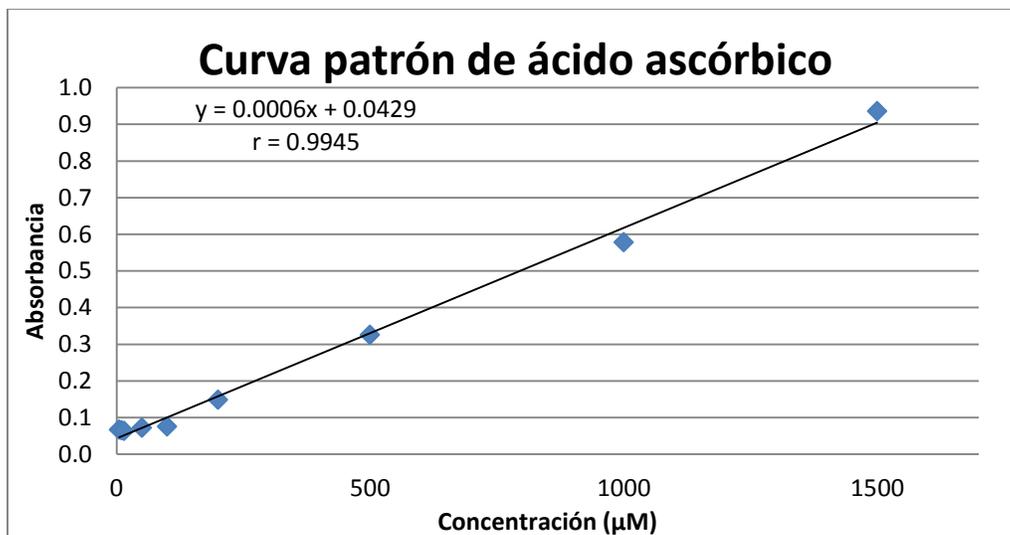


Figura 26. Curva patrón de ácido ascórbico para el ensayo de FRAP.

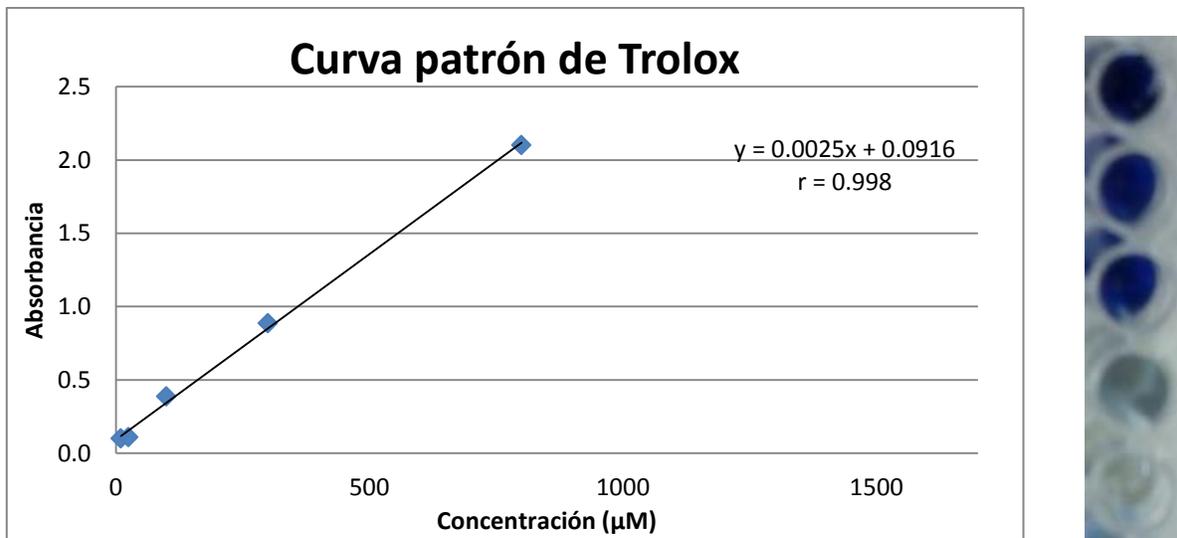
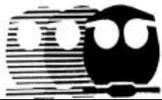


Figura 27. (a) Curva patrón de Trolox® para el ensayo de FRAP, **(b)** coloraciones obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto.

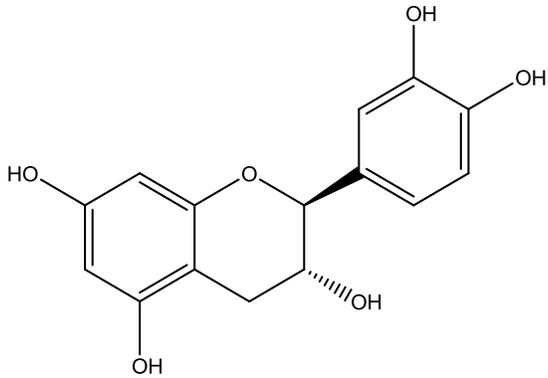
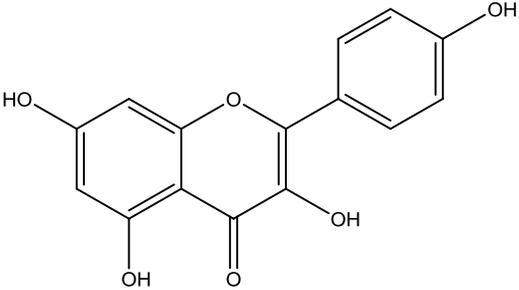
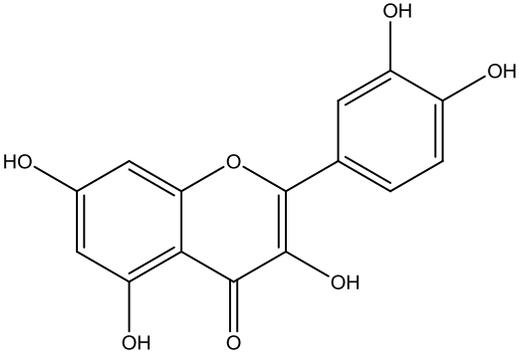
Cuadro 7. Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico y la quercetina utilizada como control positivo, para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. Se utilizó una concentración del extracto metanólico de 1.0, mg/mL para DPPH y FRAP y 0.01mg/mL para ABTS. Los resultados se reportan como el promedio de tres determinaciones y como capacidad antioxidante equivalentes a miligramos de Trolox® (TEAC) en un gramo de extracto y además como mg equivalentes a ácido ascórbico en un gramo de extracto (mg TEAC/ g extracto) para FRAP.

Sustancia de prueba	DPPH	ABTS	FRAP	
	TEAC (mg Trolox®)	TEAC (mg Trolox®)	TEAC (mg Trolox®)	mg equivalentes ácido ascórbico
Extracto metanólico	5.5	3.5	5.1	26.9
Quercetina	5.9	4.0	5.9	28.0



6.3. Caracterización de los flavonoides.

Cuadro 8. Estructuras de flavonoides purificados y caracterizados presentes en el fruto de tejocote.

Estructura	Nombre
 <p>The structure shows a flavan-3-ol core. It consists of a chromane ring system with a hydroxyl group at the 5-position and a catechol group at the 2-position. The 3-position is substituted with a catechol group. Stereochemistry is indicated with a wedged bond to the 2-position and a dashed bond to the 3-position.</p>	(-)-Epicatequina
 <p>The structure shows a flavone core. It has a hydroxyl group at the 5-position and a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position. There are also hydroxyl groups at the 7 and 8 positions.</p>	Kaempferol
 <p>The structure shows a flavone core. It has hydroxyl groups at the 5, 7, and 8 positions, and a 3,4-dihydroxyphenyl group at the 3-position.</p>	Quercetina



7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Determinación del contenido de antioxidantes

7.1.1 Determinación de flavonoides totales

La cuantificación de los flavonoides totales presentes en el extracto derivado del fruto *Crataegus mexicana*, se realizó mediante la metodología descrita por Kumazawa (2004). La concentración de flavonoides totales en el fruto del tejocote fue de 20.0 mg de flavonoides equivalentes a quercetina, por cada 100 gramos de extracto de tejocote (20.01 mg Q/100g). De acuerdo con la literatura la cantidad de flavonoides totales en los frutos de diversas especies de *Crataegus* es muy variada. En algunas especies la cantidad es menor que la encontrada en nuestro estudio, por ejemplo en *C. azarolus* (2.2 mg Q/100g) (Hashempour *et al.*, 2010), *C. opaca* (2.3 mg Q/100g) (Trappey *et al.*, 2005), *C. brettschneiri* (2.51 mg Q/100g) (Liu *et al.*, 2011), *C. laevigata* (10.0 mg Q/100g) (Svedstrom *et al.*, 2002) y *C. germanica* (3.5 mg Q/100g) (Gülcin *et al.*, 2011). Por otra parte, especies como *C. monogyna* (44.6 mg Q/100g) (Lamaison *et al.*, 1990; Baorun *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2007; Froehlicher *et al.*, 2009), *C. pentagyna* (23.68 mg Q/100g) (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008;), *C. pinnatifida* (19.44 mg Q/100g) (Zhang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011), *C. pseudoheterophylla* (Amanzadeh *et al.*, 2007; Ebrahimzadeh *et al.*, 2008; Prinz *et al.*, 2008) destacan por su alto contenido en flavonoides. Es importante mencionar que la concentración de flavonoides en los frutos de las diferentes especies de *Crategus* depende de diversos factores como el medio ambiente, la madurez del fruto y del tipo de suelo en que creció el árbol, lo que trae como resultado que no exista un rango definitivo para algún

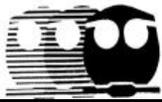


compuesto en específico, pues varía la cantidad y los tipos de flavonoides indistintamente en los frutos del género (Edwards *et al.*, 2012).

Por otra parte, la cantidad de flavonoides encontrada en el fruto puede ser comparada con las descritas en las manzanas sin cáscara como la roja (32.7 mg Q/100g), verde (17.3 mg Q/100g) y amarilla (20.9 mg Q/100g), el durazno (15 mg Q/100g), la frambuesa (26.6 mg Q/100g), la cereza (19.6 mg Q/100g), el higo (20.2 mg Q/100g), la uva verde (36.5 mg Q/100g), la zanahoria (26.7 mg Q/100g), el perejil (27.2 mg Q/100g), la pimienta verde (27.4 mg Q/100g), la col (33.1 mg Q/100g), el brócoli (18.8 mg Q/100g), la cebolla morada (18.7 mg Q/100g) (Marinova *et al.*, 2005). Sin embargo, no alcanza las concentraciones que poseen la uva morada con cáscara (77.1 mg Q/100g), la zarzamora (55.5 mg Q/100g), la mora azul (190.3 mg Q/100g), la fresa (69.7 mg Q/100g), la pera con cáscara (69.9 mg Q/100g), la manzana roja (48.6 mg Q/100g) y amarilla (34.8 mg Q/100g) ambas con cáscara, la ciruela (136.2 mg Q/100g), la lechuga (97.2 mg Q/100g) y el rábano (48.5 mg Q/100g). Sin embargo, las cantidades de flavonoides totales en el tejocote, son mayores a las reportadas para el frijol amarillo (8.2 mg Q/100g) y verde (4.1 mg Q/100g), así como para el rábano (8.9 mg Q/100g) y el jitomate (12.8 mg Q/100g) (Marinova *et al.*, 2005).

7.1.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu

La determinación de los fenoles totales presentes en el extracto derivado del fruto de *Crataegus mexicana* (tejocote) se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, el cual es considerado uno de los mejores y más antiguos métodos para



determinar el potencial antioxidante en productos naturales (Prior *et al.*, 2005). Como resultado se encontró que el extracto metanólico del tejocote contiene compuestos fenólicos en cantidades significativas.

Al comparar el contenido de fenoles totales del extracto de tejocote, el cual fue de 52.6 mg equivalentes al ácido gálico por cada 100 g de muestra (52.6 mg AG/100g) con los contenidos descritos en la literatura para otros frutos del género *Crataegus* como *C. atrosanguinea*, *C. curvisepala*, *C. meyeri*, *C. microphylla* (Amanzadeh *et al.*, 2007), *C. davisii* (Sözer *et al.*, 2006), *C. rhipidophylla*, *C. macrocarpa* (Ringl *et al.*, 2007) ésta resultó ser mayor para el tejocote. Por otra parte, el tejocote posee cantidades de fenoles similares a las descritas para especies *C. monogyna* (57.1 mg AG/100g) (Lamaison *et al.*, 1990; Baorun *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2007; Froehlicher *et al.*, 2009;), *C. pentagyna* (92.1 mg AG/100g) (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008;).

Así mismo, considerando la información encontrada en la literatura, se puede concluir que la cantidad de fenoles totales es similar a la de frutos con cierta actividad antioxidante y alto contenido de fenoles totales, como el durazno (50.9 mg AG/100g), la cereza (78.8 mg AG/100g), el higo (59.0 mg AG/100g), el jitomate (76.9 mg AG/100g), el rábano (44.9 mg AG/100g), la hoja de la cebolla (81.0 mg AG/100g), el frijol amarillo (55.7 mg AG/100g) (Marinova *et al.*, 2005). Sin embargo, la cantidad de fenoles no es comparable con frutos con reconocida actividad antioxidante como la pera con cáscara (124.7 mg AG/100g), la manzana amarilla (99.7 mg AG/100g), roja (125.4 mg AG/100g) y verde (118.1) todas con



cáscara, la zarzamora (355.3 mg AG/100g), la frambuesa (178.6 mg AG/100g), la fresa (244.1 mg AG/100g), la cereza agria (429 mg AG/100g), la mora azul (670.9 mg AG/100g) la uva verde (184.1 mg AG/100g) o morada (213.3 mg AG/100g) (Marinova *et al.*, 2005).

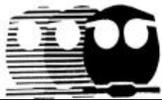
Resulta interesante observar que algunas frutas como la manzana roja, amarilla o verde se reporta en la literatura que poseen una cantidad similar de flavonoides que el tejocote, sin embargo, en cuanto a la cantidad de fenoles es mucho mayor la de las manzanas. En el caso del tejocote se tiene a la (-)-epicatequina como compuesto mayoritario, además de kaempferol y quercetina, mientras las manzanas poseen una gran cantidad de antocianidinas, quercetina, la catequina y (-)-epicatequina, entre otros compuestos fenólicos (Hagen *et al.*, 2006).

7.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante del extracto se utilizaron los ensayos de DPPH[·], de ABTS^{·+} y de FRAP. La sustancia de referencia que se utilizó para comparar y cuantificar la capacidad antioxidante de los extractos de prueba es la quercetina. Con relación a éste se calculó la TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox®), la cual indica el número de radicales de DPPH[·] o ABTS^{·+} consumidos por una molécula antioxidante (Roginsky *et al.*, 2005).

7.2.1. Ensayo del DPPH[·]

Es importante mencionar que la neutralización del radical DPPH[·] puede llevarse a cabo por dos mecanismos, la primera es a través de la transferencia de un átomo

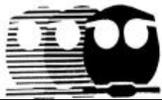


de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés *hydrogen atom transfer*) y la segunda por la transferencia de un electrón (ET, *electron transfer*). No obstante, la reacción que se lleva la mayoría de las veces es a través de la ET (Ou *et al.*, 2005).

Los valores de TEAC reportados en el **Cuadro 7** indican que el extracto metanólico del fruto de tejocote atrapa una cantidad de radicales comparable al de quercetina, utilizada como control. Los valores de TEAC obtenidos del extracto metanólico se encuentran reportados como mg de capacidad antioxidante equivalente de Trolox® por cada gramo de extracto (mg TEAC/g), en este caso los valores para éste fue de 5.5 mg TEAC/g mientras para la quercetina fue de 5.9 mg TEAC/g.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la (-)-epicatequina (flavonoide mayoritario en el extracto), junto con la quercetina representan dos de los antioxidantes más eficaces pertenecientes al grupo de los flavonoides (Kurihara *et al.*, 1995). La (-)-epicatequina, además de poseer el esqueleto básico de los flavonoides, en el anillo B presenta el grupo catecol, el cual de acuerdo a la literatura, es esencial para una alta actividad antioxidante. Los hidroxilos poseen la capacidad de quelar metales que desencadenan el estrés oxidativo y dan la estabilización del aroxi-radical por deslocalización electrónica (Procházková *et al.*, 2011).

Al comparar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de los frutos del tejocote resulta evidente que es menor a la descrita para los extractos metanólicos del capulín (19.0 mg TEAC/g), el plátano (17.5 mg TEAC/g) y la zarzamora (10.3 mg TEAC/g). Sin embargo, presenta actividad similar a la descrita para los



extractos metanólicos de la guayaba (7.5 mg TEAC/g), la ciruela (4.0 mg TEAC/g), la chirimoya (5.8 mg TEAC/g), el zapote (4.3 mg TEAC/g) y poseen más actividad antioxidante comparadas con los extractos metanólicos del jitomate (1.1 mg TEAC/g), el pepino (0.1 mg TEAC/g), la granada (0.1 mg TEAC/g) (García *et al.*, 2004).

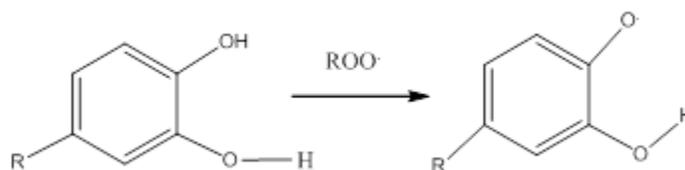


Figura 28. Estabilización del aroxi-radical en el anillo B de los flavonoides. Reproducido de Kurihara *et al.*, 1999.

7.2.2. Ensayo del ABTS

Los valores resumidos en el **Cuadro 7** indican que el extracto metanólico derivado del fruto del tejocote (3.5 mg TEAC/g) posee una potencial antioxidante similar a la quercetina (4.0 mg TEAC/g) y se reporta como actividad antioxidante equivalente a Trolox® (TEAC). Los TEACs determinados en el presente estudio para el ensayo de ABTS pueden ser comparados con los TEACs reportados en la literatura para otros frutos, evaluados utilizando el mismo ensayo, como el aguacate (0.3 mg T/g), la pera (0.8 mg TEAC/g) y el higo (1.0 mg TEAC/g), sin embargo, no son comparables con los descritos para la zarzamora (48.1 mg T/g), la mora azul (46.8 mg TEAC/g) y la fresa (40.8 mg TEAC/g) (Vasco *et al.*, 2008), pues la actividad antioxidante es mucho mayor.



La (-)-epicatequina es el flavonoide más abundante en el extracto de tejocote. Este flavan-3-ol como ya se mencionó posee un grupo catecol en el anillo B, el cual es el principal responsable de la actividad antioxidante debido a su potencial reductor. Por lo cual, el mecanismo predominante mediante el cual reacciona con el radical $ABTS^+$ es mediante la donación de un electrón al radical catiónico resultando en la formación de un semiquinona, que puede donar un electrón más externo para formar una quinona (Pannala *et al.*, 2001).

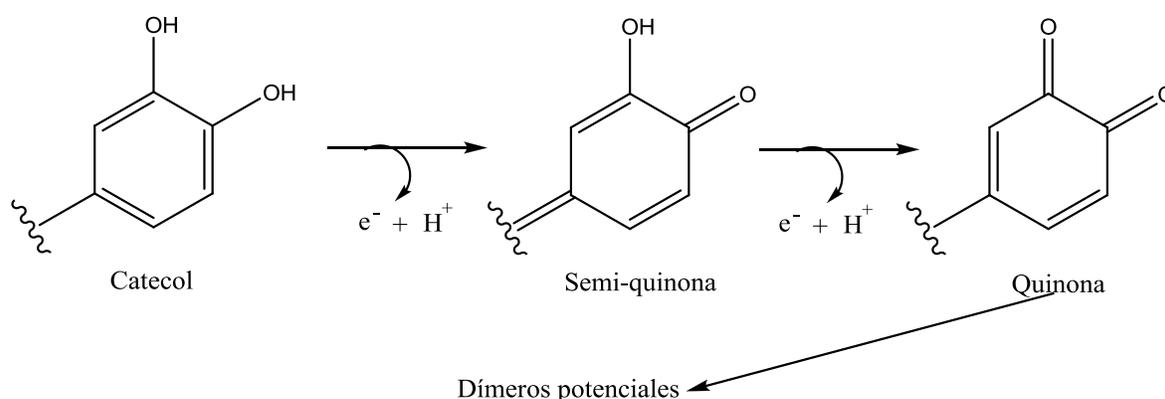


Figura 29. Oxidación potencial de productos del catecol.

7.2.3. Ensayo de FRAP

En el ensayo de FRAP se evalúa el mecanismo por el cual un antioxidante realiza su acción a través de la transferencia de un electrón. De acuerdo a la literatura, el poder de reducción parece estar relacionado con el grado de hidroxilación y por la medida de conjugación de los compuestos polifenólicos (Pulido *et al.*, 2000).

En el **Cuadro 7** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de FRAP para el extracto (5.1 mg T/g), la quercetina (5.9 mg T/g), el ácido ascórbico (26.9 mg



AA/g y 28 mg AA/g para el extracto y la quercetina, respectivamente) (valores altos) y los equivalentes de Trolox® (valores bajos), en donde se observa que el extracto metanólico posee una capacidad donadora de electrones similar a la quercetina. Estos resultados indican que el extracto metanólico contiene compuestos que pueden ejercer su acción antioxidante mediante la transferencia de electrones.

Loa TEACs obtenidos son comparables a los de los extractos de las moras (10.3 mg T/g), la piña (7.0 mg T/g), el plátano (9.7 mg T/g) y el albaricoque (4.6 mg T/g), el limón (11.6 mg T/g), la cereza (11.5 mg T/g), sin embargo, no posee una capacidad antioxidante tan fuerte como la guayaba (63.6 mg T/g), el kiwi (38.8 mg T/g), el mango (62.8 mg T/g), la naranja (19.0 mg T/g) o la ciruela (23.6 mg T/g) (Guo *et al.*, 2003).

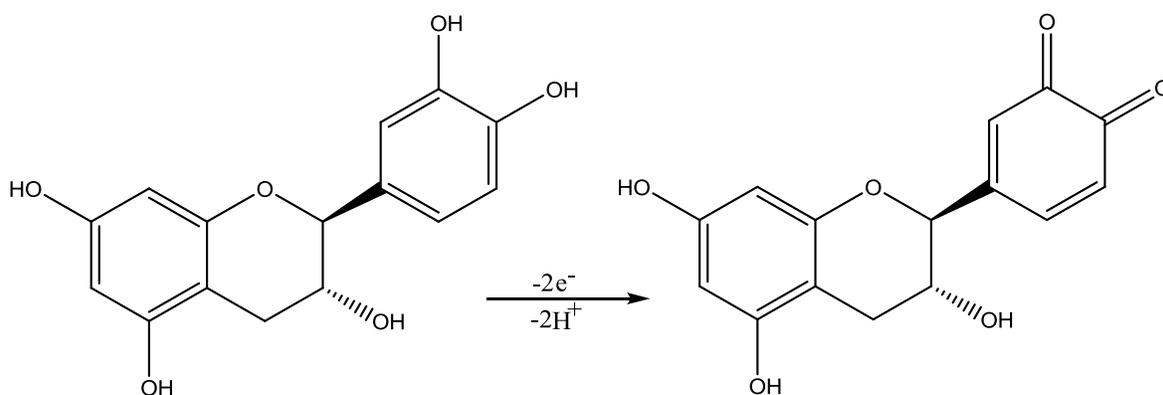


Figura 30. Generación de estructuras quinónicas después de la oxidación de los flavonoides (Modificado de Guo *et al.*, 2003).



7.3 Identificación de los flavonoides aislados a partir de los frutos del tejocote.

La identificación de la (-)-epicatequina, el kaempferol y la quercetina se realizaron por comparación directa de sus R_f , constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas por Hernández (2014) para estos compuestos en un estudio previo realizado, utilizando las hojas de *C. mexicana*.

De acuerdo a los datos reportados en la literatura, la quercetina es el flavonoide con más capacidad antioxidante, seguido de la (-)-epicatequina y después el kaempferol (Pannala *et al.*, 2001). La (-)-epicatequina es un flavonol mientras que la quercetina y el kaempferol son flavonas (Vermerris, 2008). Ahora bien, la quercetina y la (-)-epicatequina poseen mayor capacidad antioxidante por su grupo catecol en el anillo B, que como ya se explicó con anterioridad, los grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' son excelentes donadores de protones a las ROS. Además, la quercetina posee un doble enlace conjugado (2,3) y un grupo ceto en la posición 4 del anillo C y que la (-)-epicatequina no los posee, los cuales también le confieren importantes propiedades antioxidativas a la quercetina. El kaempferol cuenta con este doble enlace y grupo ceto, sin embargo, en el anillo B, sólo tiene un grupo hidroxilo en la posición 4', el cual lo hace un antioxidante con una potencia menor al de la quercetina y la (-)-epicatequina, respectivamente (Pannala *et al.*, 2001). Se le atribuye la capacidad antioxidante principalmente a la (-)-epicatequina, pues es el flavonoide mayoritario encontrado.



8. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió el aislamiento de la (-)-epicatequina, el kaempferol y quercetina a partir del extracto metanólico del fruto del tejocote.

El contenido de flavonoides totales presentes en el extracto metanólico del fruto del tejocote fue de 20.0 mg de flavonoides equivalentes a quercetina, por cada 100 gramos de extracto de tejocote (20.01 mg Q/100g). Este contenido es comparable con el reportado para frutos de otras especies del mismo género como *C. monogyna* (44.6 mg Q/100g) (Lamaison *et al.*, 1990; Baorun *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2007; Froehlicher *et al.*, 2009), *C. pentagyna* (23.68 mg Q/100g) (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008;), *C. pinnatifida* (19.44 mg Q/100g) (Zhang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011) y en otras frutas como las manzanas rojas (32.7 mg Q/100g), verdes (17.3 mg Q/100g) y amarillas (20.9 mg Q/100g) sin cáscara, el durazno (15 mg Q/100g), la frambuesa (26.6 mg Q/100g) y la cereza (19.6 mg Q/100g) (Marinova *et al.*, 2005).

El contenido de fenoles totales del extracto fue de 52.6 mg equivalentes al ácido gálico por cada 100 g de muestra (52.6 mg AG/100g). Este contenido es comparable al reportado para *C. monogyna* (57.1 mg AG/100g) (Lamaison *et al.*, 1990; Baorun *et al.*, 1994; Froehlicher *et al.*, 2009; Prinz *et al.*, 2007) y *C. pentagyna* (92.1 mg AG/100g) (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008;), durazno (50.9 mg AG/100g), la cereza (78.8 mg AG/100g), el higo (59.0 mg AG/100g), el jitomate (76.9 mg AG/100g), el rábano (44.9 mg AG/100g), la hoja de la cebolla (81.0 mg AG/100g) y el frijol amarillo (55.7 mg AG/100g) (Marinova *et al.*, 2005).



El extracto metanólico del fruto del tejocote posee una actividad antioxidante, la cual no es comparable a la descrita en la literatura para la cáscara de uva, la cáscara de manzana, la zarzamora, la fresa, la mora azul, entre otras (Guo *et al.*, 2003; Marinova *et al.*, 2005; Vasco *et al.*, 2008). En el caso del ensayo de DPPH, se obtuvo un TEAC de 5.5 mg TEAC/g, mientras que para la quercetina fue de 5.9 mg TEAC/g. En el ensayo de ABTS, el extracto presentó una TEAC de 3.5 mg T/g y la quercetina de 4.0 mg TEAC/g, en tanto que en el ensayo de FRAP, los valores de TEAC fueron de 5.1 mg TEAC/g para el extracto y 5.9 mg TEAC/g para la quercetina, así mismo, los valores equivalentes a los mg de ácido ascórbico fueron de 26.9 mg AA/g y 28 mg AA/g para el extracto y la quercetina, respectivamente.



9. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico del fruto de tejocote, con la finalidad de aislar otros componentes con capacidad antioxidante.
- Determinar el mecanismo de inhibición de radicales del extracto y compuestos puros.
- Determinar la concentración a la cual el extracto metanólico pueda ejercer un efecto prooxidante.

**10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abdul-Ghani, A., Amin, R., Suleiman, M., *et al.*, 1987. Hypotensive effect of *Crataegus oxiacantha*. *Interanational Journal of Crude Drug Research*. 25: 216-220.
2. Apel, K; Hirt, H; 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal traduction. *Annual Revision Plant Biology*. 55: 373-399.
3. Ago, T; Kuribayashi, F; Hiroaki, H; *et al.*, 2003. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 100: 4474–4479.
4. Amanzadeh, Y; Khanavi, M; Khatamsaz, M; *et al.*, 2007. High performance thin-layer chromatographic fingerprints of flavonoids and phenol carboxylic acids for standardization of Iranian species of the Genus *Crataegus* L. *Iran. Journal of Pharmacology Science*. 3: 143–152.
5. Amić, D; Davidovič-Amić, D; Bešlo, D; *et al.*, 2007. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current of Medicine and Chemistry*. 14:827–45.
6. Amić, D; Lučić, B; 2010. Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids. *Bioorganic Medical and Chemistry*. 18: 28–35.
7. Antsyshkina, A., Barabanov, E., Samylina, I., 1990. On the pharmacological activity of hawthorn preparations. *Farmatsiya*. 39: 63-65.



8. Arakawa, H; Maeda, M; Okubo, S; *et al.*, 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biology Pharmarcology Bulletin*. 27: 277–81.
9. Argueta, V., Cano, A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México D.F. P.p. 1322-1323.
10. Awad, H; Boersma, M; Boeren, S; *et al.*, 2002. The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chemistry Research in Toxicology*. 15: 343–351.
11. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., *et al.*, 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel Forschung*. 46: 1086-1089.
12. Bahorun, T; Trotin, F; Pommery, J; *et al.*, 1994. Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Medica*. 60: 323–328.
13. Bast, A; Haenen, G; Doelman, C; 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *American Journal of Medicine*. 91: 2S–13S.
14. Bayrakçeken, F; Aktas, S; Toptan, M; *et al.*, 2003. High resolution electronic absorption spectra of anisole and phenoxy radical. *Spectrochimica Acta. Part A, molecular and biomolecular spectroscopy*. 59: 135–138.
15. Boyle, S; Dobson, V; Duthie, S; *et al.*, 2000. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *European Journal of Nutrition*. 39: 213–223.



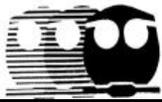
16. Breinholt, V; Lauridsen, S; Dragsted, L; 1999. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*. 29: 1227–1240.
17. Breinholt, V; Offordb, E; Brouwer, C; *et al.*, 2002. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food and Chemistry Toxicology*. 40: 609–16.
18. Breton, R. 1941. Contribución al estudio botánico, químico y farmacodinámico de *Crataegus mexicana*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F. P.p. 66.
19. Brown, J; Khodr, H; Hider, R; *et al.*, 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemistry Journal*. 330: 1173–1178.
20. Bohinc, P. 1987. Hawthorn, *Crataegus* and its therapeutics. *Medicinski Razgledi*. 26: 53-61.
21. Boots, A; Kubben, N; Haenen, G; *et al.*, 2003. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 308: 560–565.
22. Bors, W; Heller, W; Michel, C; *et al.*, 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. 186: 343–55.
23. Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew) 1933. The Mexican Hawthorn (*Crataegus pubescens* H.B.K.). 8: 289-298.



24. Burda, S; Oleszek, W; 2001 Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 2774–2779.
25. Buss, G; Constantin, J; De Lima, L; *et al.*, 2005. The action of quercetin on the mitochondrial NADH to NAD(+) ratio in the isolated perfused rat liver. *Planta Medica*. 71: 1118–1122.
26. Cabrera, L. 1982. *Plantas curativas de México*. Libro-México-Editores S. de R. L. México, D.F. Cuarta Edición. P.p.52.
27. Cadenas, E; 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. 58: 79-84.
28. Cadenas, E; 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: Ahmad S, editor. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York: Chapman & Hall. P.p. 12–30.
29. Canada, A; Giannella, E; Nguyen, T; *et al.* 1990. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radical Biology and Medicine*. 9: 441–449.
30. Cao, G; Russell, R; Lischner, N; *et al.*, 1998. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *Journal of Nutrition*. 128: 2383–2390.
31. Cao, G; Sofic, E; Prior, R; *et al.*, 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22: 749–760.
32. Cavia, M; Busto, M; Pilar, M; *et al.*, 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid



- naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 1238–1244.
33. Chan, T; Galati, G; O'Brien, PJ; 1999. Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones or flavanones. *ChemBiol Interact*. 122: 15–25.
34. Chang, C; Yang, M; Wen, H; 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drugs Analysis*. 10(3): 178-182.
35. Chang, Q., Zuo, Z; 2002. Hawthorn. *Herbal Medicine. Journal of Clinical Pharmacology*. 42: 605-612.
36. Chang, W; Lee, Y; Lu, F; et al., 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research*. 13: 2165–2170.
37. Chaudière, J; Ferrari, R; 1999. Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 37: 949-962.
38. Chen, G; Liu, W; 2005. Determination of six functional compounds in *Crataegus pinatifida* BGE by capillary zone electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography Related Technology*. 28: 223–232.
39. Chen, Z., Zhang, Z., Kwan, K., et al., 1998. Endothelium-dependent relaxation induced by hawthorn extract in rat mesenteric artery. *Life Sciences*. 63: 1983-1991.
40. Chen, J., Wu, Y., Tao, Z., et al., 1995. Hawthorn (shan zha) drink and its lowering effect on blood lipid levels in humans and rats. *World Review of Nutrition and Dietetic*. 77: 147-154.



41. Chlebda, E; Magdalan, J; Merwid-Ląd, A; *et al.*, 2010. Influence of water-soluble flavonoids, quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt and morin-5'-sulfonic acid sodium salt, on antioxidant parameters in the subacute cadmium intoxication mouse model. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 62: 105–108.
42. Choi, J; Chung, H; Kang, S; *et al.*, 2002. The structure–activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxyxynitrite. *Phytotherapy Research*. 16: 232–235.
43. Cedillo, E. 1990. Plantas útiles del municipio de Tepoztlán, Morelos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F. P.p. 272-273.
44. CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2014. Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del CEFOFOR: Usos terapéuticos tradicionales y dosificación. Coordinación General de Educación y Capacitación. Ciudad de México, México. Consultado 14 feb. 2014. Disponible en <http://www.conafor.gob.mx>
45. Cooper, K; Donovan, J; Waterhouse, A; *et al.*, 2008. Cocoa and health: a decade of research. *The British Journal of Nutrition*. 99: 1–11.
46. Cos, P; Ying, L; Calomme, M; *et al.*, 1998. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*. 61:71–76.
47. Costa, R., Occhiuto, F., Circosta, C., *et al.*, 1986. Comparative study of the cardiovascular activity of the Young shoots, leaves and flowers of *Crataegus oxyacantha*: III. Protective action on the isolated rat heart against



- arrhythmogenic agents and reperfusion arrhythmias. *Plantas Medicinales Et Phytotherapie*. 20: 115-128.
48. Croft, K; 2006. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 854: 435–442.
49. Dai, F; Chen, W; Zhou, B; 2008. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with α -tocopherol and l-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochemistry*. 90:1499–505.
50. Dai, Y., Gao, C., Tian, Q., 1987. Effect of extracts of some medicinal plants on superoxide dismutase activity in mice. *Planta Medica*. 53: 309-310.
51. Davies, A; Cai, Y; Davies, A; *et al.*, 1996. ^1H y ^{13}C NMR assignments of some Green tea polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 34: 887-890.
52. Day, A; Stansbie, D; 1995. Cardioprotective effect of red wine may be mediated by urate. *Clinical Chemistry*. 41: 1319–1320.
53. Drago, E; 2007. Flavonoides recombinates de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38(4): 42-47.
54. Dueñas, M; González, S; González; A; *et al.*, 2010. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51: 443–449.
55. Ebrahimzadeh, M; Pourmorad, F; Bekhradnia, A; 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*. 7: 3188–3192.



56. Edwards, J; Brown, P; Talent, N; *et al.*, 2012. A review of the chemistry of the genus *Crategus*. *Phytochemistry*. 79: 5-26.
57. El Amrani, F; Perello, L; Real, J; *et al.*, 2006. Oxidative DNA cleavage induced by an iron(III) flavonoid complex: synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis(flavonolato) (methanol) iron(III) complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 100:1208–1218.
58. El Hajji, H; Nkhili, E; Tomao, V; *et al.*, 2006. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Radical Research*. 40: 303–320.
59. Facino, R; Carini, M; Aldini, G; Berti F, *et al.*, 1999. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischæmic damage in rats. *Life Science*. 64: 627–642.
60. Ferralli, M; Signorini, C; Caciotti, B; *et al.*, 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*. 416: 123-129.
61. Ferriola, P; Cody, V; Middleton, E; 1989. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure–activity relationships. *Biochemical Pharmacology*. 38: 1617–1624.
62. Ferrer, D; Jorge, C; Cutiño, I; *et al.*, 1999. Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal, MEDISAN, Instituto Superior de Ciencias Médicas. 3(3): 5-11.



63. Firuzi, O; Lacanna, A; Petrucci, R; *et al.*, 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1721: 174–184.
64. Firuzi, O; Mladěnka, P; Petrucci, R; *et al.*, 2004. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56: 801–807.
65. Franco, O., Aguirre, S., Morales, E., *et al.*, 2010. Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana* DC.) de Lerma y Ocoyoacac. *Ciencia ergo sum*. 17(1): 61-66.
66. Frei, B; Higdon, J; 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*. 133: 3275-3284.
67. Froehluicher, T; Hennebelle, T; Martin, F; *et al.*, 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry*. 115: 897–903.
68. Fukushima, Y; Ohie, T; Yonekawa, Y; *et al.*, 2009. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chem*. 57: 1253–1259.
69. Galati, G; Chan, T; Wu, B; *et al.*, 1999. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chemistry Research Toxicology*. 12: 521–525.
70. Galati, G; Sabzevari, O; Wilson, J; *et al.*, 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177: 91–104.



71. Galey, J; 1997. Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Advances in Pharmacology*. 38: 167–173.
72. García, M; de Pascual, S; Santos, C; *et al*; 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*. 84: 13-18.
73. Garjani, A., Nazemiyeh H., Maleki, N., *et al.*, 2000. Effects of extracts from flowering tops of *Crataegus meyeri* A. Pojark, on ischaemic arrhythmias in anaesthetized rats. *Phytotherapy Research*. 14: 428-431.
74. Goldman, R; Claycamp, R; Sweetland, G; *et al.*, 1999. Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 27:1050–1063.
75. González, J. 1981. *Ecología Humana y Etnobotánica de un pueblo campesino de la Sierra de Nevada, Santa Catarina del Monte, Edo. De México, D.F.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. P.p. 226.
76. Guo, C; Wei, J; Yang, J; 2008. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutrition Research*. 28: 72–77.
77. Guo, C; Yang, J; Li, Y; *et al.*, 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits determined by FRAP assay. *Nutrition Research*. 23: 1719-1726.
78. Gutiérrez, D; Ortiz, C; Mendoza, A; 2008. *Medición de Fenoles y Actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal.* Centro Nacional de metrología. Universidad de Querétaro.



79. Gutiérrez, M. 1991. Plantas Medicinales de San Lucas el Grande, Estado de Puebla. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F. P.p. 31.
80. Haenen, G; Paquay, J; Korthouwer, R; *et al.*, 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 236: 591–593.
81. Hagen, S; Solhaug, K; Bengtsson, G; *et al.*, 2006. Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. *Postharvest Biology and Technology*. 41: 156-163.
82. Halliwell, B; Gutteridge, J; 1989. *Free radicals in biology and medicine*. second ed. Oxford: Clarendon Press.
83. Halliwell, B; Gutteridge, J; 1998 *Free radicals in biology and medicine*. third ed. Oxford: Oxford University Press.
84. Halliwell, B; 2007. Flavonoids: a re-run of the carotenoids story? *Dietary supplements and health*. Novartis Foundation symposium Chichester: Wiley. P.p. 93–104.
85. Halliwell, B; 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 476: 107–112.
86. Hanasaki, Y; Ogawa, S; Fukui, S; 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*.16: 845–850.



87. Hashempour, A; Ghazvini, R; Bakhshi, D; *et al.*, 2010. Ascorbic acid, anthocyanins, and phenolics contents and antioxidant activity of ber, azarole, raspberry, and cornelian cherry fruit genotypes growing in Iran. *Hortical Environment Biotechnology*. 51: 83–88.
88. Haslam E. 1989. *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
89. Heim, K; Tagliaferro, A; Bobilya, D; *et al.*, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemical*.13: 572–584.
90. Hensley, K; Benakass, E; Bolli, R; *et al.*, 2004. News perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology Medical*. 36: 1:15.
91. Hernández, E. 2008. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina por extractos de *Crataegus mexicana* Moc. Sessé silvestre y micropropagada. Tesis de Maestría, Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN. México, D.F. P.p. 79.
92. Hernández, A. 2014. Investigación química y biológica de la infusión de hojas de tejocote *Crataegus mexicana* DC. D.F. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México, D.F. P.p. 64, 74-85.
93. Hernández, I; Alegre, L; van Breusegem, F; *et al.*, 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*. 14: 125–32.
94. Hidalgo, J; 2003. *Tratado de enología*. MundiPrensa Libros. P.p. 888.



95. Hirano, R; Sasamoto, W; Matsumoto, A; *et al.*, 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. 47:357–362.
96. Hodnick, W; Duval, D; Pardini, R; 1994. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochemical Pharmacology*. 47: 573–580.
97. Hodnick, W; Kalyanaraman, B; Pritsos, C; *et al.*, 1989. The production of hydroxyl and semiquinone free radicals during the autoxidation of redox active flavonoids. In: SimicMG, Taylor KA, Ward JF, von Sonntag C, editors. *Oxygen radicals in biology and medicine*. New York: Plenum. P.p. 149–152.
98. Hodnick, W; Kung, F; Roettger, W; *et al.*, 1986. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: structure activity study. *Biochemical Pharmacology*. 35: 2345–2357.
99. Hollman, P; Katan, M; 1998. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Archives of Toxicology Supplement*. 20: 237–248.
100. Huk, I; Brovkovich, V; Nanobash, V; *et al.*, 1998. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia–reperfusion injury: an experimental study. *The British Journal of Surgery*. 85:1080–1085.
101. Iglesias, J; 2009. Diseño de integrantes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Tesis Doctorado, Universidad de Compostela, España.



- 102.** Iio, M; Ono, Y; Kai, S; 1986. Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase. *Journal Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. 32: 635–642.
- 103.** Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). 2013. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. Consultado 23 agosto de 2014. Disponible en <http://www.insp.gob.mx>
- 104.** Jovanovic, S; Hara, Y; Steenken, S; Simic, M; 1997. Antioxidant potential of theaflavins. A pulse radiolysis study. *The Journal Chemistry Society*. 119: 5337-5343.
- 105.** Jovanovic, S; Steenken, S; Simic, M; 1996. Reduction potentials of flavonoid and model peroxy radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society, Perkins Transactions*. 2: 2497-2503.
- 106.** Jung, U; Kim, H; Lee, J; *et al.*; 2003. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clinical Nutrition*. 22: 561–568.
- 107.** Justino, G; Santos, M; Canário, S; *et al.*, 2004. Plasma quercetin metabolites: structure–antioxidant activity relationships. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 432: 109–121.
- 108.** Kanakis, C; Tarantilis, P; Polissiou, M; *et al.*, 2005. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 22: 719–724.



109. Kaviarasan, K; Kalaiarasi, P; Pugalendi, V; 2008. Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermacoce hispida* in hyperlipidemic rats. *Journal of Application Biomedicine*. 6:165–76.
110. Kessler, M; Ubeaud, G; Jung, L; 2003. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *The Journal Pharmacy and Pharmacology*. 55: 131–142.
111. Kim, B; Cho, S; Reddy, A; *et al.*, 2005. Down-regulatory effect of quercetrin gallate on nuclear factor kappaB-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Biochemical Pharmacology*. 69: 1577–1583.
112. Kim, H; Cheon, B; Kim, Y; *et al.*, 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochemical Pharmacology*. 58: 759–765.
113. Kim, S., Kang, K., Kim, K., *et al.*, 2000. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-depend vasorelaxation in rat aorta. *Life Science*. 67: 121-131.
114. Khknen, M; Heinonen, M; 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:628–633.
115. Kojo, S; 2004. Vitamin C: Basic metabolism and its function as index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 11: 1041-1064.



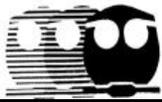
116. Kopacz, M; Kuźniar, A; 2003. Complexes of cadmium(II), mercury(II) and lead(II) with quercetin-5'-sulfonic acid (QSA). Polish Journal of Chemistry. 77: 1777–1786.
117. Korkina, L; Afanas'ev, I; 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. Advances in Pharmacology. 38:151–163.
118. Kriengsak, T; Unaroj, B; Crosby, K; 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 19: 669-675.
119. Kumazawa, S; Hamasaka, T; Nakayama, T, 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry. 84: 329-339.
120. Kurihara, K; Miyata, N; Suzuki, T; *et al.*, 1999. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 362: 79-86.
121. Lamaison, J; Carnat, A; 1990. Levels of principal flavonoids in flowers and leaves of *Crataegus monogyna* (Jacq) and *Crataegus laevigata* (Poiret) DC (Rosaceae). Pharmacy Acta Helv. 65: 315–320.
122. Landis, G; Tower, J; 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mechanism of Ageing and Development. 126: 365-379.
123. Laughton, M; Halliwell, B; Evans, P; *et al.*, 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects of lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. Biochemical Pharmacology. 38: 2859–2864.



- 124.** Lee, Y; Boerboom, A; Westphal, A; *et al.*, 2006. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpREmediated gene expression. *Chemical Research in Toxicology*. 19: 1499–1505.
- 125.** Lemańska, K; Van der Woude, H; Szymusiak, H; *et al.*, 2004. The effect of catechol Omethylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin — a mechanistic insight. *Free Radical Research*. 38: 639–647.
- 126.** Leung, H; Kuo, C; Yang, W; *et al.*, 2006. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 534:12–18.
- 127.** Li, H., Vasil'ev, A., Orekov, V., *et al.*, 1988. Antiatherosclerotic properties of medicinal plants. *Khimiko – Farmatsevticheskii Zhurnal*. 22: 1236-1241.
- 128.** Li, L., Liu, J., Shang, X., *et al.*, 1984. Studies on hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) and its active principle: I. Effect on myocardial ischemia and hemodynamics in dogs. 4: 289-292.
- 129.** Lin, Q., Chen, J., 2000. Molecular mechanism of hawthorn and its flavonoids in prevention on lipid metabolism disorder in rats. *Yingyang Xuebao*. 22: 131-136.
- 130.** Lima, L; 2002. Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades de los antioxidantes en los alimentos, Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, La Habana, Cuba.



- 131.** Linares, M. 1991. Flora útil de dos localidades del municipio de Tecali de Herrera Puebla. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F. P.p. 140.
- 132.** Liu, R; Yu, B; Qiu, S; *et al.*, 2005. Comparative analysis of eight major polyphenolic components in leaves of *Crataegus laevigata* by HPLC. *Chin. Journal Natural Medical*. 3: 162–167.
- 133.** Liu, P; Kallio, H; Lu, D; *et al.*, 2011. Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus spp.*) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Food Chemistry*. 127: 1370–1377.
- 134.** Liu, Y; Lu, B; Xu, L; *et al.*, 2010. The antioxidant activity and hypolipidemic activity of the total flavonoids from the fruit of *Rosa laevigata* Michx. *Natural Science*. 3: 175–183.
- 135.** Lotito, S; Actis-Goretta, L; Renart, M; *et al.*, 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysics Research Communications*. 276: 945–951.
- 136.** Lotito, S; Frei, B; 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*. 41: 1727–1746.
- 137.** McCord, J; 1995. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 209:112–117.



138. Maeta, K; Nomur, W; Takashume, Y; *et al.*, 2007. Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 572-580.
139. Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; *et al.*, 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal for Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
140. Marinova, D; Ribarova, F; Atanassova, M; 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40(3): 255-260.
141. Martín, M; Serrano, A; Ramos, S; *et al.*, 2010. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21: 196–205.
142. Martínez, J; 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de la Mixteca.
143. Martínez, S; González, S; Culebras, J; *et al.*; 2002. Los flavonoides, las propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17 (6): 271-278.
144. Mates, J; Pérez, C; Castro, I; 1999. Antioxidants enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32: 595-603.



145. Mattson, M; 1998. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neuroscience*. 20: 53-57.
146. Matsuda, H; Morikawa, T; Ando, S; *et al.*, 2003. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 11: 1995–2000.
147. Meister, A; 1994. Glutathione–ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 9397–9400.
148. Mellor, D; Sathyapalan, T; Kilpatrick, E; *et al.*, 2010. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabet Medicine*. 27: 1318–1321.
149. Metodiewa, D; Jaiswal, A; Cenas, N; *et al.*, 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 107–116.
150. Mishra, B; Priyadarsini, K; Kumar, M; *et al.*, 2003. Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 11: 2677–2685.
151. Moon, J; Shibamoto, T; 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (5): 1655-1666.
152. Mukai, K; Mitani, O; Nagaoka, S; 2005 Structure–activity relationship of tocopherol-regeneration reaction by catechin. *Free Radical Biology and Medicine*. 38:1243–1256.



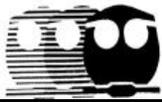
- 153.** Nácher, M; Serrano, A; Josep, M; 2007. Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS). De la Biología a la Clínica. Archivos de bronconeumonía. 43: 2-5.
- 154.** Nagata, H; Takekoshi, S; Takagi, T; *et al.*, 1999. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine. 24: 1–11.
- 155.** Nakagawa, H; Hasumi, J; Nagai, K; *et al.*, 2004. Generation of hydroxide peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. Carcinogenesis. 25: 1567–1574.
- 156.** Natella, F; Nardini, M; Giannetti, I; *et al.*, 2002. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 6211–6216.
- 157.** Naziroglu, M; Butterworth, P; 2005. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. Canadian Journal of Applied Physiology. 30: 172-185.
- 158.** Nerland, D; 2007. The antioxidant/electrophile response element motif. Drug Metabolism Review. 39: 235–248.
- 159.** Nijveldt, R; Van Nood, E; Van Hoorn, D; *et al.*, 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition. 74: 418-425.



- 160.** Obermüller, U; Francz, P; Frank, J; *et al.*, 1999. Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts. *FEBS Letters*. 460: 212–216.
- 161.** Occhiuto, F., Circosta, C., Briguglio, F., *et al.*, 1986. Comparative study of the cardiovascular activity of the Young shoots, leaves and flowers of *Crataegus oxyacantha*: I. Electrical activity and arterial pressure in the rat. *Plantas Medicinales Et Phytoterapie*. 20: 115-128.
- 162.** Ohshima, H; Yoshie, Y; Auriol, S; *et al.*, 1998. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine*. 25: 1057–1065.
- 163.** Offord, E; Gautier, J; Avanti, O; *et al.*, 2002. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*. 32: 1293–1303.
- 164.** Olszanecki, R; Gêbska, A; Kozlovski, V; *et al.*, 2002. Flavonoids and nitric oxidesynthase. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 53: 571–584.
- 165.** Osorio, D; Montoya, G; Bastida, J; 2009. Caracterización fitoquímica de una fracción de biflavonoides de *Garcinia madruno*: Inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias. *Redalyc*. 16(3): 369-377.



- 166.** Ou, B; Prior, R; Huang, D; 2005. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- 167.** Owen, C., 1932. Estudio analítico de *Crataegus mexicana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas UNAM. México, D.F. P.p. 37.
- 168.** Quiñones, M; Miguel, M; Aleixandre, A; 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1): 76:89.
- 169.** Pannala, A; Chan, T; O'Brien, J; *et al.*, 2001. Flavonoid B-ring Chemistry and antioxidant activity: Fast reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282: 1161-1168.
- 170.** Pérez, G; Martínez, G; 2001. Flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmacéutica. Bonarense*. 20(4): 297-306.
- 171.** Petkov, E., Nikolov., N., Uzunuv. P. 1981. Inhibitory effect of some flavonoids and flavonoid mixtures on cyclic AMP phosphodiesterase activity of rat heart. *Planta Medical*. 43: 183-186.
- 172.** Pietta, P; 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63:1035–1042.
- 173.** Piskula, M; Terao, J; 1998. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *The Journal of Nutrition*. 128: 1172–1178.



174. Pollard, S; Kuhnle, G; Vauzour, D; *et al.*, 2006. The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 350:960–968.
175. Popping, S., Rose, H., Ionescu, I., *et al.*, 1995. Effect of a hawthorn extract on contraction and energy turnover of isolated rat cardiomyocytes. *Arzneimittel Forschung*. 45: 1157-1161.
176. Prior, R; Cao, G; 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticulture Science*. 35: 588–592.
177. Prior, R; Wu, X; Schaich, K; 2005. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and food in Chemistry*. 53: 4290-4302.
178. Prinz, S; Ringl, A; Huefner, A; *et al.*, 2007. 400 0-Acetylvitexin-200-Orhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). *Chemistry and Biodiversity*. 4: 2920–2931.
179. Procházková, D; Bousová, I; Whilhelmová, N; 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82: 513-523.
180. Pulido, R; Bravo, L; Saura, F; 2000. Antioxidant capacity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemirtry*. 48: 3396-3402.



- 181.** Rajendran, S., Deepalaskshmi, P., Parasakthy, K., *et al.*, 1996. Effect of tincture of *Crataegus* on the LdL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis*. 123: 235-241.
- 182.** Reboul, E; Thap, S; Perrot, E; *et al.*, 2007. Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, γ -tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on α -tocopherol absorption. *The European Journal Clinical of Nutrition*. 61: 1167–1173.
- 183.** Rewerski, W., Lewak, S., 1967. Pharmacological properties of flavan polymers isolated from hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). *Arzneimittel Forschung*. 17: 490-491.
- 184.** Rice, A; Miller, N; Paganga, G; 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 933–956.
- 185.** Ringl, A; Prinz, S; Huefner, A; *et al.*, 2007. Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (R) and (S)-eriodictyol-7-O-glucuronide and luteolin-7-Oglucuronide. *Chemistry and Biodiversity*. 4: 154–162.
- 186.** Ríos de Molina, C; 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Viva Química, Argentina*, 2(1): 17-28.
- 187.** Roginsky, V; Lissi, E; 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92: 235-254.



188. Rojano, B; Saez, J; Schinella, G; 2008. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *Journal of Molecular Structure*. 877: 1-6.
189. Rubbo, H; Radi, R; Trujillo, M; *et al.*, 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *The Journal of Biology and Chemistry*. 269: 26066–26075.
190. Rzedowski, J., Calderón, G. 2005 *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. México, Michoacán. P.p. 49.
191. Sahu, S; Gray, G; 1996. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters*. 104: 193–196.
192. Santos, M; Rodríguez, M; Justino, G; *et al.*, 2008. Influence of the metabolic profile on the in vivo antioxidant activity of quercetin under a low dosage oral regimen in rats. *British Journal of Pharmacology* 153: 1750–1761.
193. Sarkar, K; Howard, R; 1976. Specificity of the vanillin test of flavonols. *Journal of Food and Agricultural Chemistry* 24(2): 317-320.
194. Schussler, M., Holzl, J., Fricke, U., 1995. Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus species*. *Arzneimittel Forschung*. 45: 842-845.
195. Shanti, R., Parasakthy, K., Deepalakshmi, P., *et al.*, 1996. Protective effect of tincture of *Crataegus* on oxidative stress in experimental atherosclerosis in rats. *Journal Clinical Biochemistry Nutrition*. 20: 211-223.



- 196.** Shanti, R., Parasakthy, K., Deepalakshmi, P., *et al.*, 1994. Hypolipidemic activity of tincture of *Crataegus* in rats. *Indian Journal Bichemistry Biology*. 31: 143-146.
- 197.** Shoskes, D; 1998. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*. 66: 147–152.
- 198.** SEMART (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2014. Manual que establece los criterios técnicos para el aprovechamiento sustentable de recursos forestales no maderables de clima árido y semiárido.
- 199.** Singleton, L; Rossi, A; 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acids reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- 200.** Sözer, U; Donmez, A; Mericli, A; 2006. Constituents from the leaves of *Crataegus davisii*. *Science Pharmacy*. 74, 203–208.
- 201.** Spencer, J; 2003. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr*. 133: 3255S–3261S.
- 202.** Spencer, J; 2007. The interactions of flavonoids within neuronal signaling pathways. *Genes Nutr* 2007;2: 257–73.
- 203.** Spencer, J; Kuhnle, G; Williams, R; Rice, C; 2003. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochemistry Journal*. 372: 173–181.



- 204.** Spencer, J; Schroeter, H; Crossthwaite, *et al.*, 2001. Contrasting influences of glucuronidation and Omethylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology Medical*. 31: 1139–1146.
- 205.** Stadler, N; Lindner, R; Davies, M; 2004. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 24: 949–954.
- 206.** Strain, J; Benzie, I; 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of " antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- 207.** Sun, C; Fu, J; Chen, J; *et al.*, 2010. On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures. *Journal of Separation Science*. 33: 1018–1023.
- 208.** Stahl, W; Van den Berg, H; Arthur. J; *et al.*, 2002. Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects Medical*. 23: 39–50.
- 209.** Svedstrom, U; Vuorela, H; Kostianen, R; *et al.*, 2006. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal Chromatography A*. 1112: 103–111.
- 210.** Szeląg, A; Magdalan, J; Kopacz, M; *et al.*, 2003. Assessment of efficacy of quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt in the treatment of acute



- chromium poisoning: experimental studies. Polish Journal of Pharmacology. 55: 1097–103.
211. Recursos Forestales no Maderables de Clima Templado-Frío. Subsecretaría de Fomento y Normatividad Ambiental. Ciudad de México, México. Consultado 8 feb. 2014. Disponible en <http://www.semarnat.gob.mx>
212. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola 2014. SAGARPA, Ciudad de México, México. Consultado 4 feb. 2014. Disponible en <http://www.siap.gob.mx>
213. Taubert, D; Breitenbach, T; Lazar, A; *et al.*, 2003. Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 35:1599 -607.
214. Twaij, H., Ker'ý, A., Jeboory, A., *et al.*, 1987. *Crataegus azarolus* Linn; pharmacology. Journal of Biological Sciences Research. 18: 105-126.
215. Terao, J; 1999. Dietary flavonoids as antioxidants in vivo: conjugated metabolites of (-)-epicatechin and quercetin participate in antioxidative defence in blood plasma. Journal Medical Investigation. 46: 159–168.
216. Torres, J; Lozano, C; Maher, P; *et al.*, 2005. Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity. Phytochemistry. 66: 2032–2037.
217. Trappey, A; Bawadi, H; Bansode, R; *et al.*, 2005. Anthocyanin profile of mayhaw (*Crataegus opaca*). Food Chemistry. 91: 665–671.



- 218.** Umeki, S; 1994. Mechanisms for the activation/electron transfer of neutrophil NADPH-oxidase complex and molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Ann Hematology*. 68: 267–277.
- 219.** Ursini, F; Maiorino, M; Morazzoni, P; *et al.*, 1994. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology Medical*. 16: 547–553.
- 220.** Van Acker, S; Tromp, M; Haenen, G; *et al.*, 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemistry Biophysics Response Community*. 214: 755–759.
- 221.** Vasco, C; Ruales, J; Kamal, E; 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 111: 816-823.
- 222.** Velázquez, M; Prieto, B; Contreras, R; 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Revista de Ciencias*. 75: 36-43.
- 223.** Vermerris, W; Nicholson, R; 2006. Phenolic compound Biochemistry. Springer, University of Florida, USA. P.p. 1-32.
- 224.** Venéreo, J; Gutiérrez, R; 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31 (2): 126-133.
- 225.** Vivar, M., Salazar, J., Calva, G., *et al.*, 2005. Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus Pubescens*) fruit. *LWT*. 40:278-284.



- 226.** Wilms, L; Kleinjans, J; Moonen, E; *et al.*, 2008. Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*. 22: 301–307.
- 227.** Yamashita, N; Tanemura, H; Kawanishi, S; 1999. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutate Responsive*. 425: 107–115.
- 228.** Yeh, S; Wang, W; Huang, C; *et al.*, 2005. Pro-oxidative effect of β -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *Journal Nutrition Biochemistry*. 16:729–35.
- 229.** Yen, G; Duh, P; Tsai, H; *et al.*, 2004. Pro-oxidative properties of flavonoid in human lymphocytes. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 67: 1215–1222.
- 230.** Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., 2001. Characterization of antioxidants presents in hawthorn fruits. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 12: 144-152.
- 231.** Zhang, P; Zhou, Y; Xu, S.; 2001a. Two novel flavonoid glycosides from *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major NEBr. *Journal Asian Natural Products Res*. 3: 77–82.
- 232.** Zhu, Q; Huang, Y; Chen, Z; 2000 Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal Nutrition Biochemistry*.11: 14–21.



233. Zhu, Q; Huang, Y; Tsang, D; 1999. Regeneration of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechins. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 47: 2020–2025.