

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA



**“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO
CLOROGÉNICO Y DE FLAVONOIDES PRESENTES EN
HOJAS Y FRUTOS DE *Crataegus gracilior* PHIPPS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

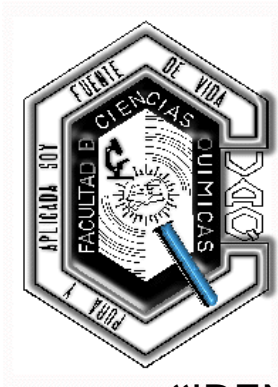
PRESENTA

MARÍA GABRIELA BERNARDA LÓPEZ CORONA

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO Y DE FLAVONOIDES PRESENTES EN HOJAS Y FRUTOS DE *Crataegus gracilior* PHIPPS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA GABRIELA BERNARDA LÓPEZ CORONA

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

DIRECTOR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODAL

Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

SINODAL

Dra. MARICELA GONZÁLEZ LEAL

SINODAL

RESUMEN

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios de mayor distribución en el reino vegetal. Esos compuestos han sido objeto de muchas investigaciones en los últimos años, debido a su capacidad protectora y a veces curativa contra muchas enfermedades degenerativas como el cáncer, la diabetes, la hipertensión, el envejecimiento prematuro, etc. Esas propiedades medicinales se deben en parte a las características antioxidantes de dichos compuestos, presentes en plantas medicinales y alimenticias. Extractos acuosos y orgánicos estandarizados de muchas especies vegetales del género *Crataegus* (tejocotes) se usan actualmente para tratar la hipertensión arterial. Los compuestos responsables de esa actividad farmacológica han sido identificados hasta ahora como fenoles simples y flavonoides. Sin embargo, los tejocotes mexicanos no han sido estudiados desde el punto de vista químico y farmacológico. La presente propuesta se enfocó a determinar, como un paso previo a una estandarización más completa, alguno de los compuestos fenólicos presentes en extractos de las hojas y los frutos de *Crataegus gracillior*, especie recolectada en el estado de Querétaro. Para la realización de esos estudios químicos, se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (UV) y un total de diecisiete estándares. La identificación se basó en la comparación de los tiempos de retención y los espectros UV de los componentes detectados en los extractos y los de los estándares. Se identificaron el ácido clorogénico y los flavonoides rutina, kaempferol, (+)-catequina y quercetina. El ácido clorogénico se encontró en hojas y frutos, mientras que los demás compuestos se identificaron únicamente en las hojas. Finalmente, los compuestos identificados se cuantificaron, siendo la (+)-catequina la mayoritaria.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Los compuestos fenólicos en la naturaleza	1
1.2 Diversidad estructural de los compuestos fenólicos comunes en plantas	1
1.2.1 Fenoles simples y fenilpropanoides	1
1.2.2 Flavonoides y estilbenos	3
1.3 Importancia biológica de los compuestos fenólicos naturales	4
1.3.1 Estudios epidemiológicos	4
1.3.2 Actividades farmacológicas de algunos compuestos fenólicos	5
1.4 El género <i>Crataegus</i>	8
1.4.1 Distribución	8
1.4.2 Características botánicas de <i>Crataegus gracilior</i>	8
1.4.3 Estudios farmacológicos efectuados con especies del género <i>Crataegus</i>	10
1.4.4 Antecedentes químicos de especies de <i>Crataegus</i>	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 General	13
3.2 Específicos	13
4. METODOLOGÍA	14

4.1	Materiales y equipos	14
4.1.1	Material de estudio	14
4.1.2	Equipos	14
4.1.2.1	Procesamiento del material vegetal	14
4.1.2.2	Procesamiento de los extractos	14
4.1.2.3	Análisis de los extractos	14
4.2	Métodos	15
4.2.1	Preparación de los extractos	15
4.2.1.1	Extracto metanólico (EM)	15
4.2.1.2	Extractos acuosos	15
4.2.2	Análisis de compuestos fenólicos	15
4.2.2.1	Análisis de fenoles individuales	15
4.2.3	Hidrólisis ácida de los extractos	16
4.2.4	Hidrólisis básica de los extractos	16
4.2.5	Condiciones en HPLC	16
4.2.6	Identificación de los compuestos fenólicos	16
4.2.7	Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados	17
5	RESULTADOS	18
5.1	Preparación de los extractos	18
5.2	Identificación de los compuestos fenólicos	18
5.2.1	Determinación de los tiempos de retención de los estándares	18
5.2.2	Análisis de las muestras	20
5.2.2.1	Compuestos identificados en el EM	20
5.2.2.1.1	Identificación del ácido clorogénico	20
5.2.2.1.2	Identificación de la rutina	21
5.2.2.2	Identificación del ácido clorogénico en los extractos acuosos no hidrolizados del fruto	23
5.2.2.2.1	Identificación del ácido clorogénico en el extracto acuso obtenido por decocción del fruto no hidrolizado (EADF)	24
5.2.2.2.2	Identificación del ácido clorogénico en el extracto acuoso obtenido por maceración del	

fruto no hidrolizado (EAMF)	25
5.2.2.3 Compuestos identificados en el extracto metanólico hidrolizado en medio ácido (EMH)	26
5.2.2.3.1 Identificación de la (+)-catequina	26
5.2.2.3.2 Identificación de la quercetina	27
5.2.2.3.3 Identificación del kaempferol	28
5.2.2.4 Extracto metanólico hidrolizado en medio básico (EMB)	29
5.2.2.5 Extractos acuosos del fruto hidrolizados en medio básico (EAFB) y en medio ácido (EAFH)	30
5.3 Cuantificación del ácido clorogénico y de la rutina identificados en el extracto metanólico no hidrolizado	30
5.3.1 Cuantificación del ácido clorogénico	31
5.3.2 Cuantificación de la rutina	33
5.4 Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en el EMH	34
5.4.1 Cuantificación de la (+)-catequina	34
5.4.2 Cuantificación de la quercetina	35
5.4.3 Curva de calibración del kaempferol	36
5.5 Cuantificación del ácido clorogénico en los extractos obtenidos por decocción y por maceración del fruto no hidrolizados	36
5.5.1 Cuantificación de ácido clorogénico en el EADF	36
5.5.2 Cuantificación de ácido clorogénico en el EAMF	37
6 DISCUSIÓN	38
6.1 Identificación y cuantificación de algunos de los compuestos fenólicos presentes en los extractos	38
6.2 Actividades farmacológicas de los compuestos fenólicos identificados	39
7 CONCLUSIONES	42
8 REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Algunos ácidos benzoicos comunes en plantas	2
2	Fenilpropanoides frecuentemente buscados en plantas medicinales y alimenticias por sus efectos benéficos sobre la salud humana	3
3	Estructuras de los flavonoides más comunes	4
4	Cromatograma de la mezcla de los estándares	19
5	Cromatograma del ácido clorogénico y de la (-)-epicatequina	19
6	Cromatograma del EM	20
7	Comparación de los cromatogramas del ácido clorogénico, del EM y de la coelución	21
8	Espectros UV del ácido clorogénico puro y del pico correspondiente a este estándar en el EM no hidrolizado	21
9	Comparación de los cromatogramas de la rutina, del EM y de la coelución	22
10	Espectros UV de la rutina pura y del pico correspondiente a este estándar en el EM no hidrolizado	22
11	Cromatograma del extracto obtenido por decocción del fruto no hidrolizado	23
12	Cromatograma del extracto obtenido por maceración del fruto no hidrolizado	23
13	Comparación de los cromatogramas de la ácido clorogénico, del EADF y de la coelución	24
14	Espectros UV del ácido clorogénico puro y del pico correspondiente a este estándar en el EADF	24
15	Comparación de los cromatogramas de la ácido clorogénico, del EAMF y de la coelución	25
16	Espectros UV del ácido clorogénico puro y del pico correspondiente a este estándar en el EAMF	25
17	Cromatograma del extracto metanólico hidrolizado en medio ácido	26

18	Comparación de los cromatogramas de la (+)-catequina, del EMH y de la coelución	27
19	Espectros UV de la (+)-catequina y del pico correspondiente a este estándar en el EMH	27
20	Comparación de los cromatogramas de la quercetina, del EMH y la coelución	28
21	Espectros UV de la quercetina y del pico correspondiente a este estándar en el EMH	28
22	Comparación de los cromatogramas del kaempferol, del EMH y de la coelución	29
23	Espectros UV del kaempferol y del pico correspondiente a este estándar en el EMH	29
24	Cromatogramas de la mezcla de estándares y del EMB	30
25	Cromatogramas de la mezcla de estándares y de la decocción del EAFH y del EAFB	31
26	Cromatogramas de la mezcla de estándares y de la maceración del EAFH y del EAFB	31
27	Curva de calibración realizada con el ácido clorogénico puro	32
28	Curva de calibración realizada con la rutina pura	33
29	Curva de calibración realizada con la (+)-catequina pura	34
30	Curva de calibración realizada con la quercetina	35
31	Curva de calibración realizada con el kaempferol	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunas enfermedades tratadas con flavonoides	7
2	Gradiente que se utilizó durante los análisis y la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de <i>Crataegus gracilior</i>	17
3	Rendimientos de extractos obtenidos de las hojas y de los frutos de <i>Crataegus gracilior</i> Phipps	18
4	Resumen de los compuestos fenólicos identificados y algunos de sus datos analíticos	39

1. ANTECEDENTES

1.1 Los compuestos fenólicos en la naturaleza

De manera general, se puede entender como fenol, todo compuesto con uno o varios anillos bencénicos a los cuales se encuentran enlazados uno o varios hidroxilos. Los compuestos fenólicos naturales se encuentran ampliamente distribuidos en particular en el reino vegetal, donde se sintetizan con varios propósitos. Dependiendo de su estructura particular, se ha descrito que tienen el papel de impartir color para contribuir de esta forma a la polinización. También intervienen en la sobrevivencia de la planta, actuando como agentes protectores en contra de infecciones fúngicas y la radiación solar. Otros compuestos fenólicos intervienen en procesos fisiológicos como la fotosensibilización, la transferencia de energía, la respiración, el control de la fotosíntesis, etc. (Cushnie y Lamb 2005).

1.2 Diversidad estructural de los compuestos fenólicos comunes en plantas

En base a la estructura química de su núcleo básico, los compuestos fenólicos se clasifican en fenoles simples, ácidos fenólicos (C_6-C_1), ácidos hidroxicinámicos, también conocidos como fenilpropanoides (C_6-C_3) y flavonoides ($C_6-C_3-C_6$).

1.2.1 Fenoles simples y fenilpropanoides

Algunos compuestos fenólicos simples, exclusivamente biosintetizados por plantas y microorganismos, y cuya ingestión se requiere por los animales para el buen funcionamiento de su organismo, incluyen ácidos benzoicos simples y ciertos aminoácidos aromáticos. Son familiares entre los primeros, los ácidos gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), para-aminobenzoico (PABA), vanílico y salicílico (Figura 1). Todos ejercen efectos biológicos importantes. El ácido gálico es el componente estructural principal de los llamados taninos hidrolizables (pentagaloilglucosos) presentes en muchos alimentos y plantas medicinales. El PABA forma parte de

la estructura química del ácido fólico (o vitamina B9) cuya deficiencia en el organismo conduce a la anemia.

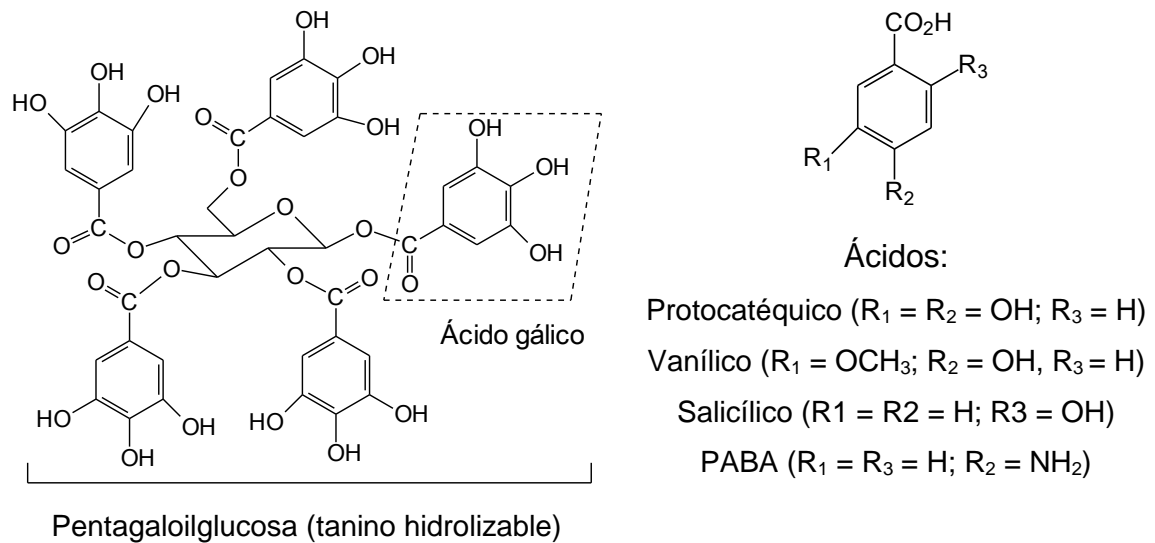


Figura 1. Algunos ácidos benzoicos comunes en plantas.

Los ácidos cinámicos (también conocidos como fenilpropanoides) como el *para*-cumárico, el caféico, el ferúlico y el sinápico (Figura 2) son otros metabolitos secundarios frecuentemente buscados en las plantas por sus variados efectos farmacológicos.

El ácido clorogénico (o ácido 5-*O*-cafeoilquínico), la 1-*O*-cinamoilglucosa y la sinapina (o sinapoilcolina) son otros ejemplos de ésteres del ácido cinámico que frecuentemente se encuentran en las plantas. Al ácido clorogénico, se le han atribuido varias funciones biológicas importantes: como antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral y antiviral, mientras que como medicamento, se usa para tratar la diabetes, la hiperlipidemia y la hepatitis (Yonathan y col., 2006; Chen y col., 2008).

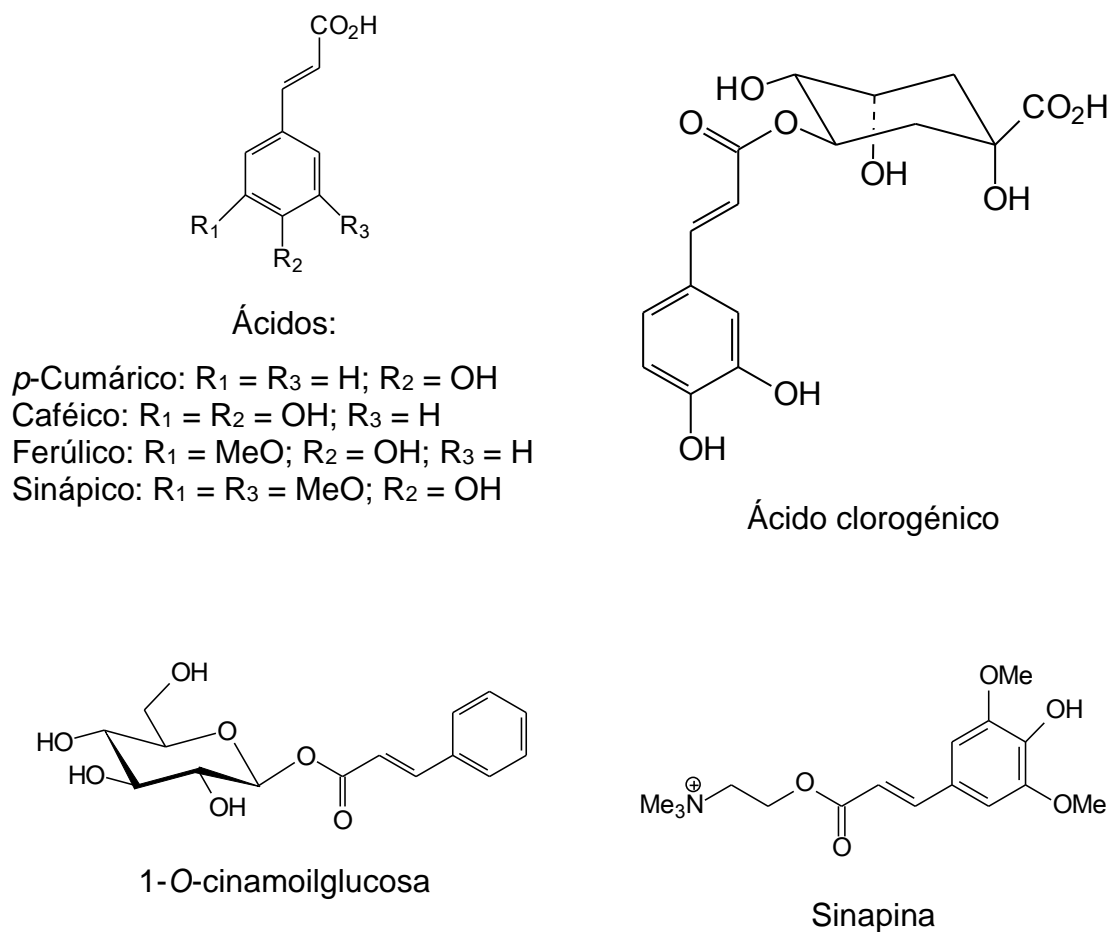
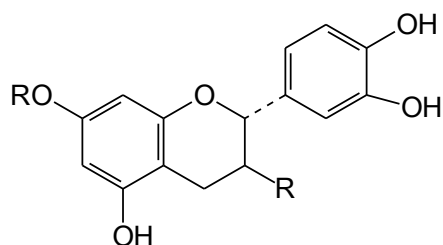


Figura 2. Fenilpropanoides frecuentemente buscados en plantas medicinales y alimenticias por sus efectos benéficos sobre la salud humana.

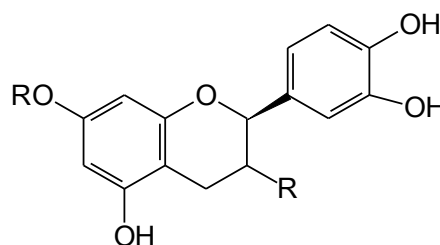
1.2.2 Flavonoides y estilbenos

Los flavonoides son los metabolitos secundarios biológicamente activos más ubicuos en el reino vegetal y son responsables de la prevención de muchas enfermedades degenerativas. Se han identificado más de cuatro mil flavonoides. Entre los más comunes se encuentran las catequinas, la quercetina, el kaempferol, la apigenina, la rutina y la luteolina y sus correspondientes C- y O-glicósidos (Figura 3). Las catequinas (que tienen dos centros quirales y por lo tanto cuatro isómeros) forman polímeros difícilmente hidrolizables llamados taninos condensados, los cuales, junto con los taninos hidrolizables, imparten la astringencia a los alimentos y bebidas. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina son

los isómeros ópticos más comunes en la naturaleza (Weyant y col., 2001; Abd El-Hady, 2007; Grace y col., 2009).



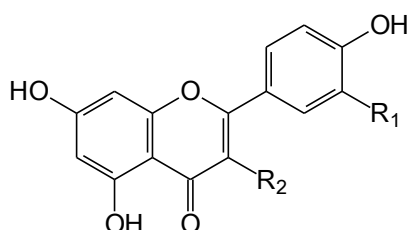
R = β -OH: (+)-Catequina (2R, 3S)



R = α -OH: (-)-Catequina (2S-3R)

R = α -OH: (-)-Epicatequina (2R-3R)

R = β -OH: (+)-Epicatequina (2S-3S)

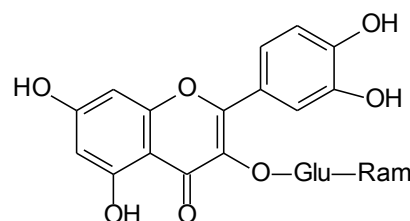


R₁ = H, R₂ = OH: Kaempferol

R₁ = R₂ = OH: Quercetina

R₁ = R₂ = H: Apigenina

R₁ = OH, R₂ = H: Luteolina



Rutina: 3-O-rutinósido de quercetina

[rutinósido = ramnosil(α 1 \rightarrow 6)glucosa]

Figura 3. Estructuras de los flavonoides más comunes.

1.3 Importancia biológica de los compuestos fenólicos naturales

1.3.1 Estudios epidemiológicos

Numerosos estudios han corroborado la relación directa existente entre el contenido en compuestos fenólicos de plantas alimenticias y la capacidad de éstas para prevenir las enfermedades degenerativas como el cáncer, la diabetes, los padecimientos cardiovasculares y la obesidad (Kris-Etherton y col., 2002; Chin-Lin y Gow-Chin, 2008; Oomah y col., 2010). Por ejemplo, en base a estudios científicos se ha sugerido que una ingesta diaria de 400-600 g de frutas y verduras reduce el riesgo de padecer cáncer de próstata (Shukla y Gupta,

2005). Se han identificado las rutas mediante las cuales los compuestos fenólicos contenidos en los alimentos intervienen para controlar la tumorigénesis prostática. Se ha establecido que su actividad antioxidante, la cual ejercen a través del secuestro y la formación de quelatos con metales, capturando los excesos de radicales libres, es la principal responsable de sus efectos farmacológicos preventivos (Soobrattee y col., 2005).

Por otra parte, hay estudios científicos que sostienen que los radicales libres juegan un papel importante en los procesos inflamatorios (Closa and Folch-Puy, 2004; Kao *et al.*, 2005; Kielland *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2010). Por lo tanto, tiene sustento pensar que los compuestos fenólicos, como agentes antioxidantes, pueden prevenir o suprimir la inflamación, la cual está directamente involucrada en la generación de enfermedades cardiovasculares, como en el caso de la ruptura de la placa aterosclerótica, responsable directa del llamado síndrome coronario agudo (Jiang y Dusting-G, 2003).

1.3.2 Actividades farmacológicas de algunos compuestos fenólicos

El estudio de las actividades biológicas de las plantas medicinales y alimenticias y sus constituyentes químicos tiene gran vigor en la actualidad, debido a los estudios epidemiológicos antes mencionados. Los compuestos fenólicos contenidos en esos remedios comparten la propiedad de ser agentes antioxidantes que demuestran actividades antiinflamatorias, antimutagénicas, antitrombóticas, anticancerosas y antivirales (Chin-Lin y Gow-Chin, 2008; Graef y col., 2010). La actividad antiinflamatoria se ejerce a través de muy variados mecanismos bioquímicos, los cuales incluyen la inhibición de la adhesión molecular, la expresión de los genes que codifican citocina y quimosina, la inhibición de la función plaquetaria, el aumento de la liberación de óxido nítrico y otros efectos sobre factores proinflamatorios tales como la metaloproteinasa endotelina (Jiang y Dusting-Gregory, 2003). La actividad farmacológica de algunos compuestos fenólicos individuales ha sido descrita. Por ejemplo, el ácido caféico inhibe la proliferación del músculo liso, la cual fue inducida por la angiotensina II en ratas hipertensas (Peng-Gao y col., 2005). Más recientemente, se ha comprobado que los ácidos fenólicos, incluyendo los

producidos en el colon durante el metabolismo, en general ejercen su actividad antiinflamatoria actuando como agentes antiglicantes y como modificadores de algunas rutas metabólicas, protegiendo a los consumidores contra la diabetes (Chi-Hao y col., 2010; Del Rio y col., 2010). Agentes antiglicantes son compuestos que impiden la glicosilación no enzimática que se lleva a cabo entre proteínas y azúcares reductores (reacción química conocida como glicación o también reacción de Maillard). Esos glicósidos singulares se conocen como productos Amadori (Ayatollahi y col., 2010). Su metabolismo posterior genera otros productos finales que desencadenan una cascada de respuestas que complican la diabetes. Por lo tanto, los inhibidores de la glicación tienen gran potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de la diabetes y del envejecimiento prematuro (Singh y col., 2001; Aronson, 2003).

Se han descrito estudios que sostienen firmemente que entre los compuestos fenólicos, los flavonoides en particular revierten la disfunción endotelial vascular, reduciendo de esta forma el riesgo de ataques cardiacos (Duffy y Vita, 2003).

Numerosos estudios indican que los flavonoides ejercen efectos benéficos sobre la salud al prevenir o revertir varias enfermedades degenerativas como el cáncer (Lopez-Lazaro, 2002; Mojzisoza y Mojziz, 2008; Shun-Fa y col., 2008), la hipertensión (Moline y col., 2000; Harnafi y Amrani, 2007; Mulvihill y Huff, 2010), la diabetes (Shan y col., 2008; Sharma y Shah, 2010) y la inflamación (Kim y Kim, 1993; Borissova y col., 1994; Panthong y col., 1994; Liu y col., 2004). En el Cuadro 1, se incluyen algunas enfermedades tratadas con flavonoides y su blanco de acción.

Cuadro 1. Algunas enfermedades tratadas con flavonoides (adaptado de Sandhar y col., 2011).

Enfermedad	Flavonoide
Úlcera	Kaempferol, Catequinas y meciadanol Quercetina
Artritis reumatoide	Apigenina, rutina
Inflamación	Quercetina, apigenina, catequinas, hesperidina rutina, luteolina, kaempferol, quercetina, miricetina, fisetina
Cancer	Quercetina, kaempferol, galangina, apigenina, naringina, genisteina, luteolina, catequinas
Disfunción de la memoria	Genisteína, quercetina, fisetina
Depresión	Naringenina, 2S-hesperidina, linarina
Enfermedades cardiovasculares	Quercetina, 7-monohidroxiethyl-rutósido, 7,3',4'-trihidroxi-rutósido
Diabetes mellitus	Fisetina, Quercetina
Antialérgicos	Quercetina, rutina, citrina
Hepatoprotectores	Quercetina, avicularina, hirustrina, onitina, luteolina
Trombosis	Tangeratina, hesperidina, quercetina, rutina, nobelitina, sinesetina

Se ha descrito que algunos flavonoides, en particular los derivados de la luteolina, la rutina y el hiperósido, producen un aumento del flujo sanguíneo coronario, una regulación del ritmo cardiaco y la presión sanguínea en el ventrículo izquierdo (Schüssler y col., 1995a y b).

1.4 El género *Crataegus*

1.4.1 Distribución

El género *Crataegus* está constituido aproximadamente por 140 especies distribuidas en todo el mundo (Phipps y col., 2003).

En México, el género está integrado por quince especies, todas conocidas como tejocote, trece de las cuales se encuentran en el norte y en el centro del país (Phipps, 1997), mientras que dos habitan en el sur. Diez de esas especies son endémicas. Se han encontrado en 20 de los 32 estados de la República Mexicana. Las regiones donde se encuentra más abundante la especie son las que se ubican en la Sierra Madre Oriental, en la Occidental y en la del Sur, así como en el eje neo-volcánico de clima templado, semidesértico, desértico y subtropical (desde Veracruz hasta Jalisco) (Núñez-Colín y col., 2008). Las más utilizadas son *Crataegus mexicana* DC. y *Crataegus gracilior* Phipps, aunque en la parte norte del país, sobre todo en Coahuila y Nuevo León, se consume también el tejocote rojo (*Crataegus greggiana* Ettl.). En Querétaro, se encuentra *Crataegus mexicana* DC. en el municipio de Amealco (Serrano y col., 1992). Esta especie crece silvestre, pero también es cultivada (Núñez-Colín y col., 2008). Los frutos de este género son muy apreciados en México por el contenido en vitamina C de sus infusiones (tés), las cuales se usan para prevenir enfermedades respiratorias. Asimismo, especies europeas y chinas de *Crataegus* se emplean como remedio tradicional para enfermedades cardíacas, sobre todo por su efecto cardiotónico que ayuda a estabilizar la presión arterial (Schüssler y col., 1995a y b).

1.4.2 Características botánicas de *Crataegus gracilior*

De acuerdo a los últimos estudios reportados por Rzedowski y Calderon-de-Rzedowski (2005), esta especie tiene las dos siguientes sinonimias: *Mespilus pubescens* y *Crataegus pubescens*. Según los autores, este último nombre ya no se puede usar para esta planta, ya que el mismo ha sido atribuido posteriormente a otra planta del mismo género. Los nombres comunes registrados en la zona de colecta son tejocote y tejocote sin espinas. Los

autores realizan la siguiente descripción de la planta para su identificación botánica: "*C. gracilior* es un árbol (o a veces arbusto) hasta de 10 m de alto, pero por lo general de talla mucho menor, caducifolio, provisto de espinas rectas, delgadas pero fuertes, hasta de 2.5 cm de largo, en ocasiones parcial o totalmente desprovisto de las mismas; ramillas tiernas con frecuencia café-rojizas o verdosas, vilosas, las más maduras grisáceas y glabrescentes; estípulas lanceoladas, hasta de 1 cm de largo por 0.5 a 2 mm de ancho, otras veces oblanceoladas o falcadas, algo más cortas y anchas, pronto deciduas, con glándulas cortamente estipitadas en el margen, peciolo de 5 a 10(15) mm de largo, canaliculados en el haz, láminas foliares amplia o estrechamente elípticas a lanceoladas, romboides, oblanceoladas u obovadas, de (2.5)4 a 7.5(10) cm de largo por (1.5)2 a 4(4.5) cm de ancho, ápice agudo o a veces redondeado, base por lo general cuneada, margen serrado hacia la parte superior con dientes glandulíferos y entero hacia el medio o tercio inferior, vena media hundida en el haz, prominente en el envés, con 6 o 7 pares de las laterales evidentes, de textura membranácea, de color más oscuro en el haz, prácticamente lampiñas en ambas caras en la madurez, salvo las nervaduras principales vilosas, sobre todo en la juventud; inflorescencias corimbiformes, de 5 a 12 flores, brácteas con frecuencia presentes, semejantes a las estípulas, caedizas, pedicelos blanco-vilosos; flores hasta de 1.2 cm de diámetro; hipantio algo blanco-viloso por fuera, segmentos del cáliz estrechamente triangulares o lanceolados, de (3)4 a 6 mm de largo, con el ápice agudo o romo, a veces denticulado, y el margen serrado-glanduloso y/o provisto de glándulas estipitadas, a veces entero, por lo común glabros por fuera, pubescentes por dentro; pétalos blancos, suborbiculares, cortamente unguiculados, de 4 a 7(8) mm de largo y de ancho; estambres alrededor de 20, dispuestos en 2 verticilos de longitud algo desigual, anteras oblongas, de 0.8 a 1.2(1.4) mm de largo; estilos 2 o 3(4); fruto amarillo claro, más o menos globoso o con frecuencia tendiendo a oblato, de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, en ocasiones ligeramente pubescente, núculas 2 a 4".

"Elemento representado en la zona de estudio en la porción norte y centro de Querétaro. Se encuentra por lo común en forma abundante en la vegetación secundaria derivada del bosque mesófilo de montaña, del de encino y de pino-

encino. Alt. 1100-2400 m. Se ha colectado en flor entre marzo y mayo; en fruto entre abril y septiembre. Especie endémica del noreste y este de México. N.L., Tamps., S.L.P., Qro., Hgo. Dada su afinidad por ambientes perturbados, la planta no presenta problemas de supervivencia”.

1.4.3 Estudios farmacológicos efectuados con especies del género *Crataegus*

Varias especies de *Crataegus* han sido utilizadas en la medicina tradicional de diversos países en el mundo para tratar problemas cardiovasculares y digestivos, o como astringentes o analgésicos (Kim y Kim, 1993; Mericli y Melikoglu, 2002). Esos usos han conducido a la investigación química y farmacológica de algunas especies. Los efectos farmacológicos sobre el sistema cardiovascular han sido atribuidos a los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos) y aminas cardiotónicas encontrados en ellas (Kocylidiz y col., 2006). Estudios clínicos con extractos estandarizados de *Crataegus monogyna* Jacq (Lindm), *C. laevigata* (Poir) DC y otras especies han demostrado ser eficientes en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Fong-Harry y Bauman, 2002). Como estudio farmacológico de *Crataegus pinnatifida* va. *pubescens*, se describieron en México un efecto hipoglucemiante del extracto obtenido por decocción (Román-Ramos y col., 1992) y recientemente un efecto antimicótico en contra de dos hongos subcutáneos patógenos (*Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*) (Gaitán y col., 2011). No existen estudios farmacológicos efectuados con *Crataegus gracilior*.

1.4.4 Antecedentes químicos de especies de *Crataegus*

La mayoría de las especies estudiadas se encuentran en los continentes asiático (China y Corea) y europeo. De esas, se han aislado o caracterizado compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, entre los cuales han sido frecuentes taninos (Kovalyova y col., 2008), glicósidos de orientina e isoorientina (Nikolov y col., 1982; Budzianowski y col. 1991; Prinz y col., 2007), quercetina, luteolina, apigenina, vitexina, hesperetina, etc. (Petri y col., 1988; Mericli y Melikoglu, 2002; Melikoglu y col., 2004) y rutina (Nikolov y Nauchnoizsled, 1973; Prinz y col., 2007). De *Crataegus pinnatifida* va. *pubescens*, sólo hay un estudio

químico realizado en Corea donde se aislaron dos flavonoides (8-C- β -D-glucopiranosil apigenina y 8-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil apigenina (Kim y Kim, 1993). De *Crataegus gracilior*, no existen reportes de estudios químicos.

2. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos y metanólicos de los frutos y las hojas de la especie mexicana de *Crataegus gracilior* contienen cantidades apreciables de algunos de los compuestos fenólicos que se usan actualmente para tratar diversas enfermedades.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Identificar en los extractos de las hojas y los frutos de *Crataegus gracilior* algunos de los compuestos fenólicos que actualmente se usan para el tratamiento de diversas enfermedades.

3.2 Específicos

- Obtener el extracto metanólico de las hojas y dos extractos acuosos de los frutos.
- Conocer la naturaleza de algunos de los compuestos fenólicos más comunes presentes en los extractos, utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (UV).
- Cuantificar los compuestos fenólicos identificados.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales y equipos

4.1.1 Material de estudio

Extracto metanólico de las hojas y extractos acuosos de los frutos de la planta medicinal *Crataegus gracilior*.

4.1.2 Equipos

4.1.2.1 Procesamiento del material vegetal

Estufa eléctrica, marca FELISA, para secado del material vegetal.

Molino manual, marca VICTORIA.

4.1.2.2 Procesamiento de los extractos

Tres rota-evaporadores.

Bombas de vacío de diferente alcance.

Liofilizadora Labconco, modelo Freezone 6.

4.1.2.3 Análisis de los extractos

Balanza analítica marca Ohaus (0.0001 g).

Columna analítica XDB-C18, 4.6 x 150 mm con tamaño de poro de 3.5 μm , (Agilent Technologies), con pre-columna ZORBAX (Agilent Technologies).

Un sistema cromatográfico (HPLC) marca Waters integrado por una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, acoplada a un sistema de detección. Como detector, se dispone de un aparato de absorción en el ultravioleta-visible de arreglo de diodos, modelo 2998 (Waters). El equipo está provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i y un desgasificador electrónico de cuatro canales (Metachem Technologies Inc.). La adquisición y el procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el programa Empower2 (Waters).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparación de los extractos

4.2.1.1 Extracto metanólico (EM)

Se utilizó una cierta cantidad de material vegetal seco y molido, la cual se desengrasó con hexano y posteriormente se agregó metanol para preparar el extracto de las hojas a partir del mismo material vegetal seco. Como método de extracción, se recurrió a la maceración por una semana con cada disolvente (hexano, diclorometano y metanol, en este orden). Se evaporaron los disolventes hasta sequedad en el caso del hexano y el metanol.

4.2.1.2 Extractos acuosos

Una porción de los frutos se sometió a decocción siguiendo el método tradicional usado para la preparación del “ponche”. De manera independiente, se preparó otro extracto acuoso mediante la maceración de los frutos frescos y cortados en pedazos. Cada extracto acuoso se congeló a $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se secó mediante liofilización.

4.2.2 Análisis de compuestos fenólicos

4.2.2.1 Análisis de fenoles individuales

Para el análisis cualitativo de los compuestos fenólicos, se pesó 1 mg de cada estándar (17 estándares) y 1 mg de cada extracto para preparar diluciones finales de alrededor de $0.1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Los estándares se disolvieron en 1 ml de metanol y los extractos originales se disolvieron en metanol o en agua, dependiendo del extracto. Posteriormente, se filtraron las soluciones en acrodiscos con tamaño de poro de $45\text{ }\mu\text{m}$ y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies). Dicha preparación se mantuvo en viales color ámbar para proteger de la luz componentes fotosensibles en solución. Para la cuantificación de los estándares detectados, se obtuvieron curvas de calibración para cada uno de ellos preparando cuatro o cinco diluciones.

4.2.3 Hidrólisis ácida de los extractos

En un matraz de 100 ml, se colocaron alrededor de 100 mg de extracto seco. Se agregaron 10 ml de agua grado cromatográfico (HPLC) o metanol, de acuerdo a la solubilidad. Posteriormente, se agregaron 5 ml de HCl 2 N y la mezcla se puso a reflujo durante dos horas. Transcurrido ese tiempo, 20 μ l de la mezcla de reacción o diluciones adicionales se analizaron para la búsqueda de compuestos fenólicos.

4.2.4 Hidrólisis básica de los extractos

Se siguió la misma técnica que para la hidrólisis ácida, sustituyendo el ácido clorhídrico por NaOH 2 N.

4.2.5 Condiciones para la HPLC

Se utilizó un método estandarizado para la caracterización de compuestos fenólicos en el que las condiciones a utilizar fueron: columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m, 4.6 x 150 mm de diámetro interno) con precolumna marca Agilent; fase móvil: gradiente (Cuadro 2); flujo: 0.7 ml/min; λ de detección: 280 nm; línea de inyección: 20 μ L; tiempo de corrida: 40 min. Con esas condiciones, se determinaron, por triplicado, los perfiles cualitativo y cuantitativo de las muestras.

4.2.6 Identificación de los compuestos fenólicos

La identificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención (Tr), así como los espectros UV-Visible de los picos generados por cada muestra y los de los estándares. Como estándares, se utilizaron los siguientes compuestos: a) los ácidos: gálico, protocatético, caféico, *p*-cumárico, rosmarínico y clorogénico; b) los flavonoides: (+)-catequina, hesperidina, rutina, miricetina, luteolina, quercetina, apigenina, hesperetina, kaempferol y epicatequina, por ser comunes y naringenina por estar disponible.

Cuadro 2. Gradiente que se utilizó durante los análisis y la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de *Crataegus gracilior*.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	Ácido acético 0.0125 N	CH3CN
0	95%	5%
2.0	95%	5%
5.0	85%	15%
20.0	50%	50%
25.0	95%	5%
35.0	95%	5%

4.2.7 Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados

Se prepararon las siguientes concentraciones ($\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) de cada uno de los estándares identificados: (+)-catequina: 0.320, 0.427, 0.533 y 0.640; quercetina: 0.017, 0.033, 0.067 y 0.133; kaempferol: 0.009, 0.007, 0.004 y 0.004; rutina: 0.040, 0.053, 0.080 y 0.160; ácido clorogénico: 0.029, 0.015, 0.010 y 0.007. Con las áreas bajo la curva que se obtuvieron, se estableció una curva de calibración para cada estándar, de la cual se pudo establecer una correlación lineal del tipo $y = ax + b$, ésta a su vez permitió calcular la concentración de cada uno de los compuestos fenólicos presentes en los extractos.

5. RESULTADOS

5.1 Preparación de los extractos

Se obtuvieron dos extractos acuosos, uno a partir de la decocción y otro a partir de la maceración del fruto, y un extracto metanólico a partir de las hojas secas de *Crataegus gracilior* Phipps. Los porcentajes de los rendimientos se reportan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Rendimientos de extractos obtenidos de las hojas y de los frutos de *Crataegus gracilior* Phipps.

Extracto	Rendimiento (%)
Metanólico (hojas)	13.78
Acuoso (decocción del fruto)	6.73
Acuoso (maceración del fruto)	7.25

5.2 Identificación de los compuestos fenólicos

5.2.1 Determinación de los tiempos de retención de los estándares

Utilizando las condiciones de resolución de los componentes de los extractos bajo investigación, se determinó de manera individual el tiempo de retención de cada uno de los compuestos fenólicos utilizados como estándares. Posteriormente, se obtuvieron los tiempos de retención relativos de los estándares en la mezcla de quince de ellos (Figura 4) y de manera independiente en la mezcla del ácido clorogénico y la (-)-epicatequina (Figura 5). Teniendo en cuenta que los tiempos de retención pueden variar ligeramente de una inyección a otra, se realizó una coelución de cada extracto con cada uno de los estándares, cuya presencia en él se detectó. Se efectuó entonces una superposición de los tres perfiles así obtenidos (estándar, extracto y extracto eluido con el estándar). Este análisis permitió confirmar o destacar la presencia de los compuestos correspondientes. Como criterio adicional, y dentro del marco de los desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos por efecto de disolventes

e interacciones de los metabolitos, se compararon los espectros UV-visible de los picos identificados con los de los correspondientes estándares.

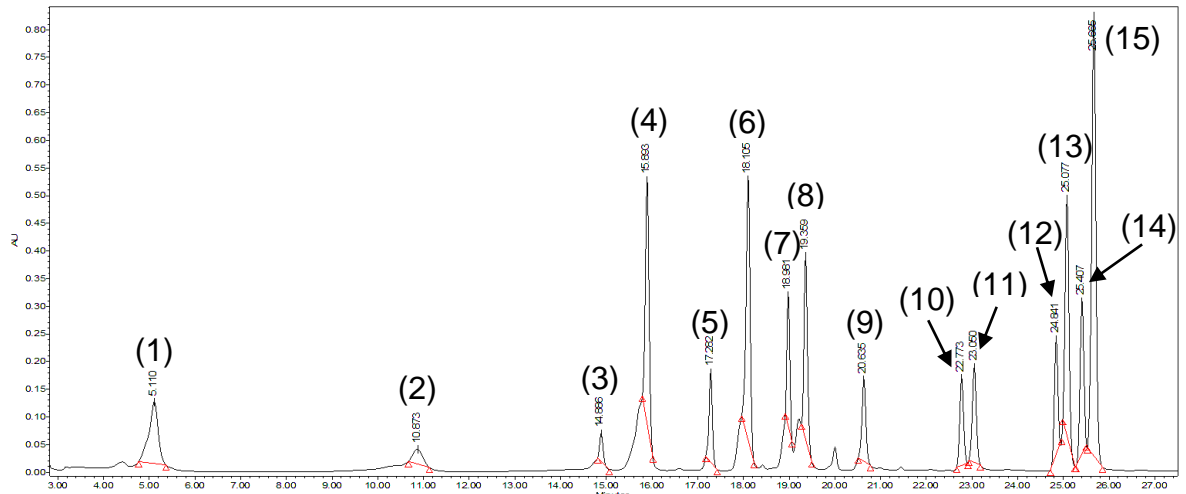


Figura 4. Cromatograma de la mezcla de los estándares. (1) Ácido gálico, (2) ácido protocatético, (3) (+)-catequina, (4) ácido caféico, (5) rutina, (6) ácido *p*-cumárico, (7) hesperidina, (8) ácido rosmarínico, (9) miricetina, (10) luteolina, (11) quercetina, (12) apigenina, (13) naringenina, (14) kaempferol, (15) hesperetina.

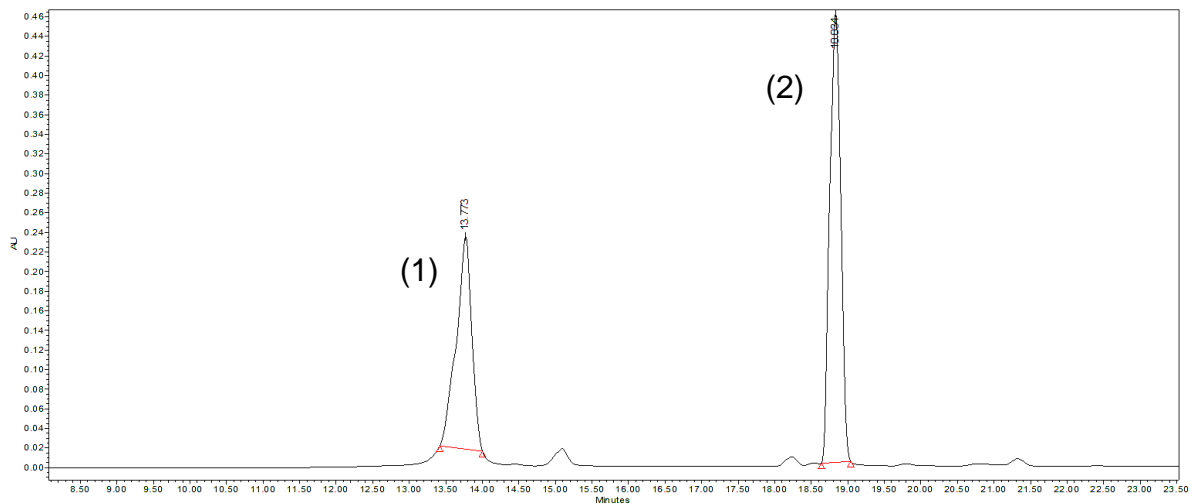


Figura 5. Cromatograma del ácido clorogénico (1) y de la (-)-epicatequina (2).

5.2.2 Análisis de las muestras

El análisis de las muestras generó los cromatogramas que a continuación se presentan y mediante los cuales se identificaron algunos de los estándares buscados en los extractos.

5.2.2.1 Compuestos identificados en el EM

En el EM, se detectó la rutina (Tr 17.23 min) y el ácido clorogénico (Tr 13.99 min) (Figura 6).

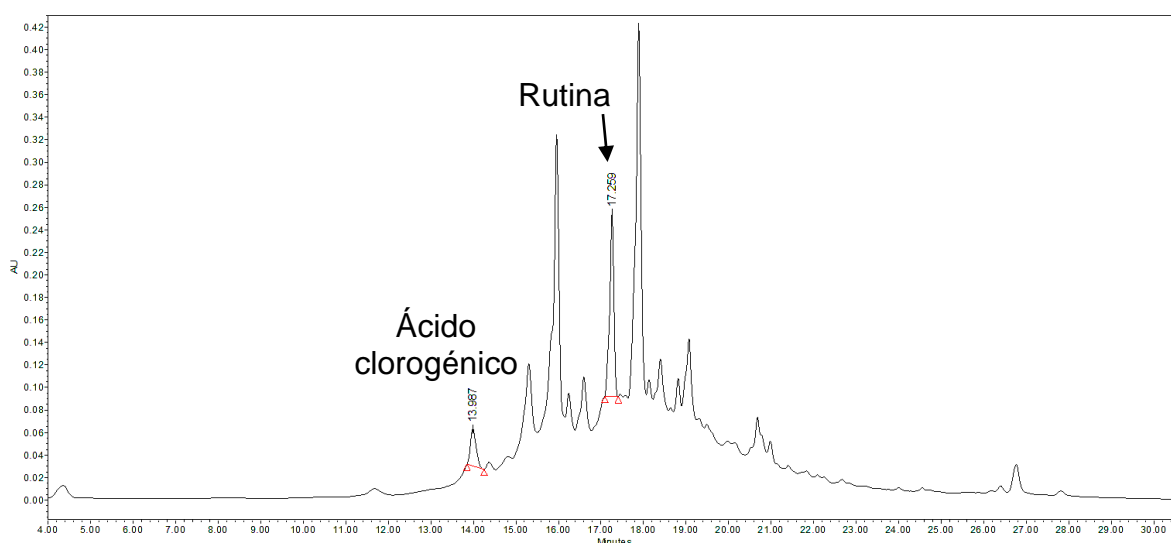


Figura 6. Cromatograma del EM.

5.2.2.1.1 Identificación del ácido clorogénico

La comparación de los cromatogramas del estándar (negro), del extracto metanólico (azul) y de la coelución de ambos (verde) (Figura 7) permitió identificar claramente la presencia del ácido clorogénico, ya que se observó un incremento en la intensidad del pico con tiempo de retención de 13.99 min; dicha identidad se confirmó con los respectivos espectros UV (Figura 8).

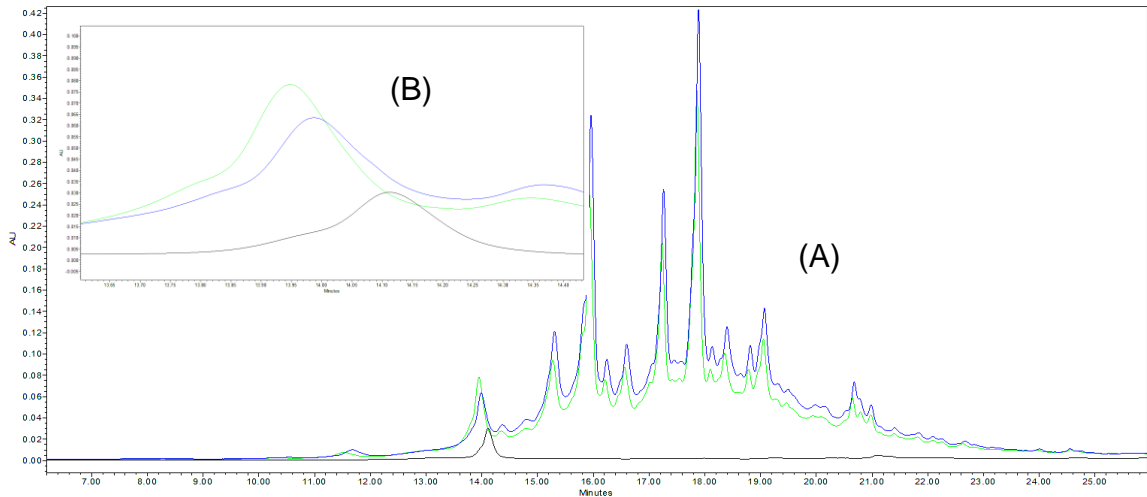


Figura 7. (A) Comparación de los cromatogramas del ácido clorogénico (negro), del EM (azul) y de la coelución (verde); (B) Ampliación de la zona entre 13.6 y 14.5 min.

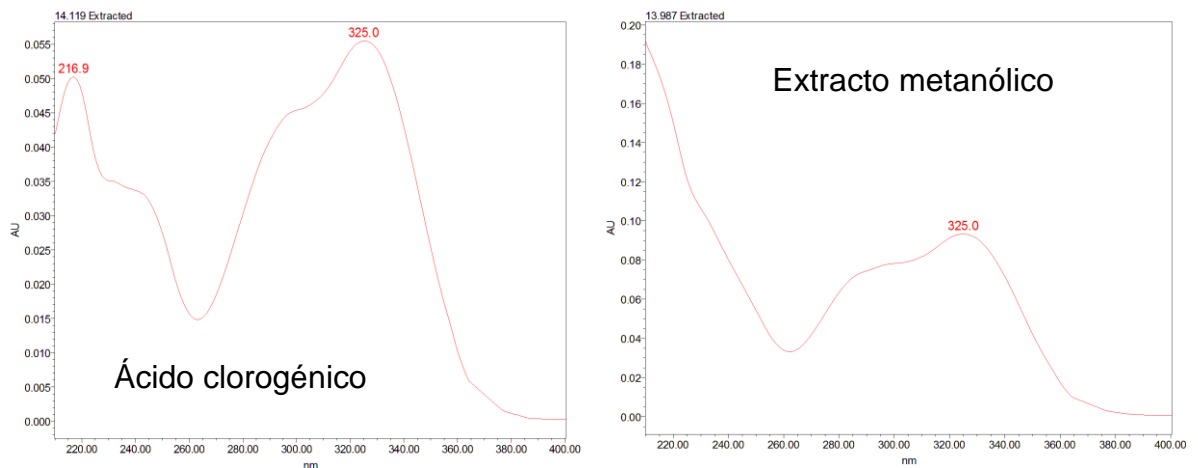


Figura 8. Espectros UV del ácido clorogénico puro (λ_{\max} 216.9 nm y 325.0 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EM no hidrolizado (λ_{\max} 325.0 nm).

5.2.2.1.2 Identificación de la rutina

La comparación de los cromatogramas del estándar (negro), del extracto metanólico (azul) y de la coelución de ambos (verde) (Figura 9) permitió identificar claramente la presencia de la rutina, observándose un incremento en la intensidad del pico de la coelución de ambos con tiempo de retención de

17.23 min; dicha identidad se confirmó con los respectivos espectros UV (Figura 10).

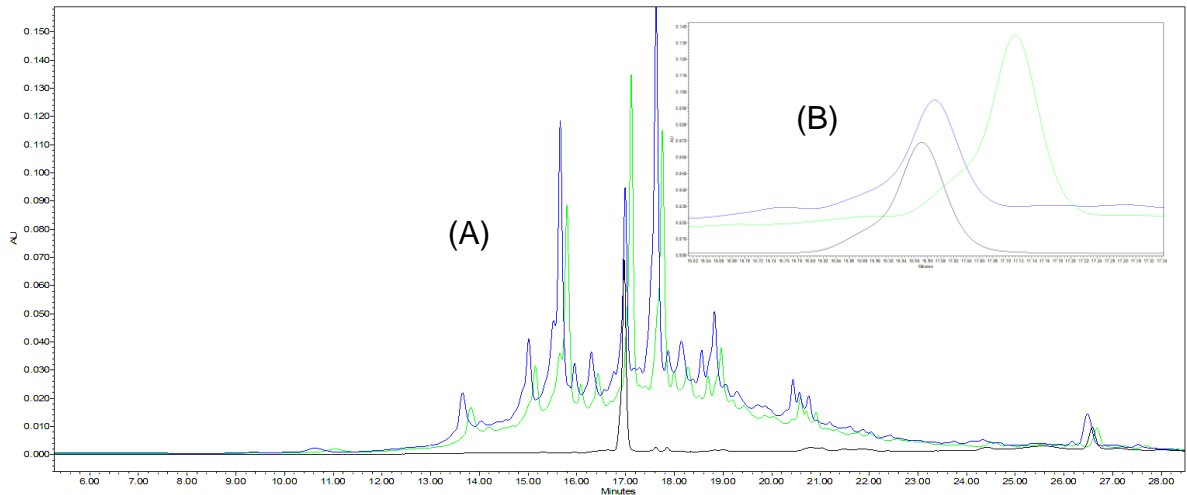


Figura 9. (A) Comparación de los cromatogramas de la rutina (negro), del EM (azul) y de la coelución (verde); (B) Ampliación de la zona entre 16.6 a 17.4 min.

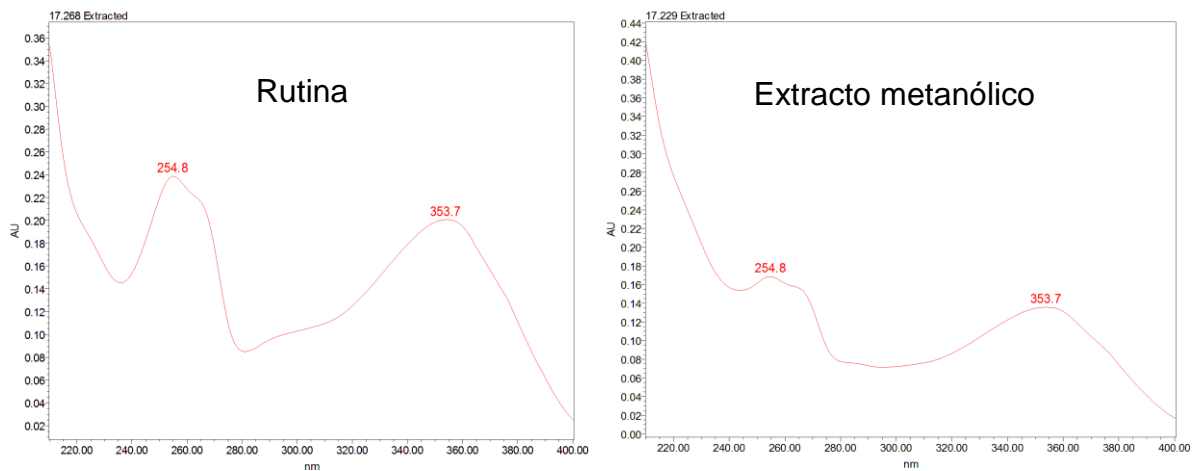


Figura 10. Espectros UV de la rutina pura (λ_{\max} 254.8 nm y 353.7 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EM no hidrolizado (λ_{\max} 254.8 nm y 353.7 nm).

5.2.2.2 Identificación del ácido clorogénico en los extractos acuosos no hidrolizados del fruto

En los extractos acuosos obtenidos por decocción y por maceración del fruto, se detectó el ácido clorogénico ($Tr \approx 14.0$ min) (Figuras 11 y 12).

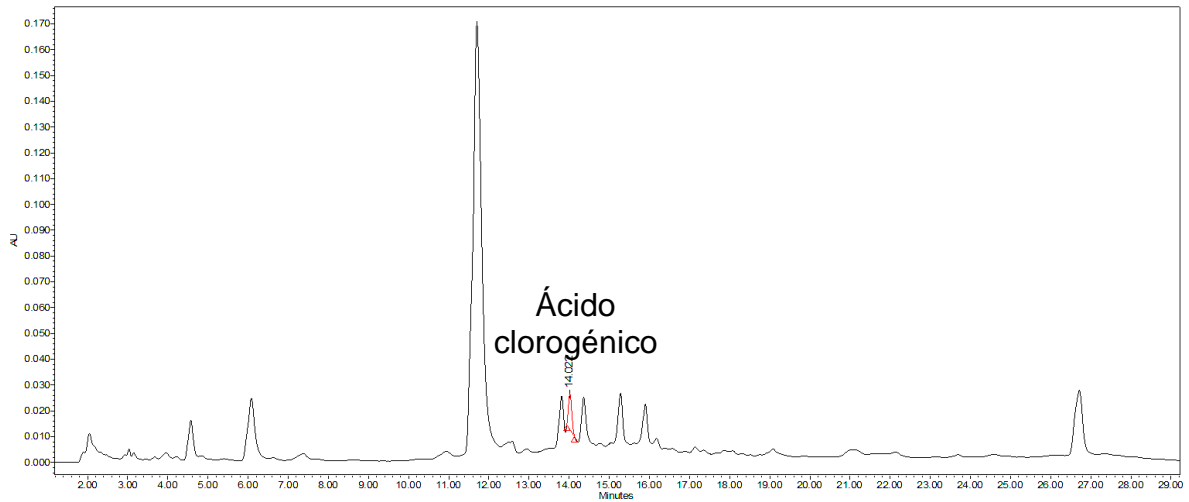


Figura 11. Cromatograma del extracto obtenido por decocción del fruto no hidrolizado.

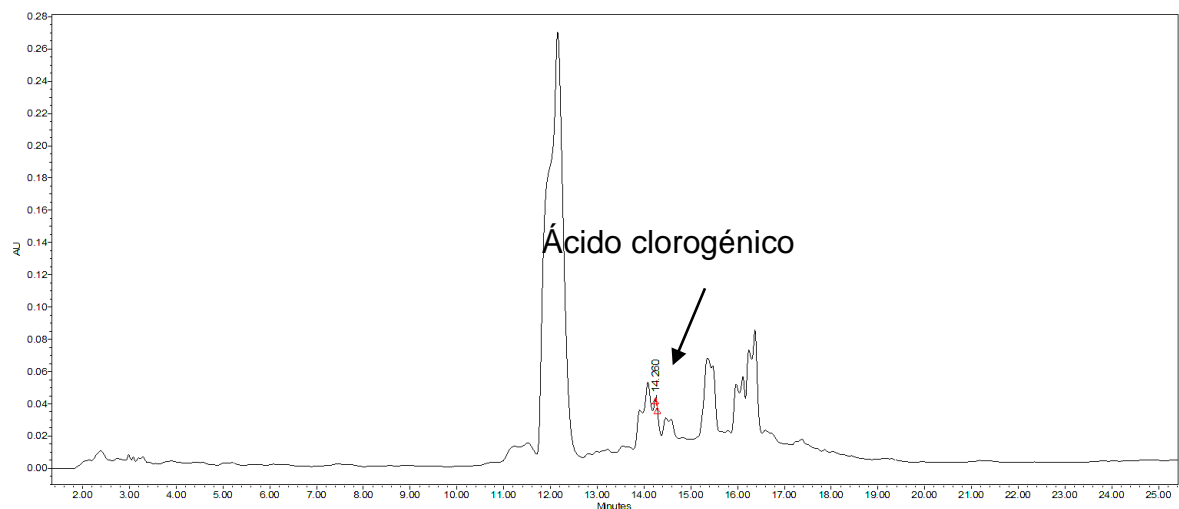


Figura 12. Cromatograma del extracto obtenido por maceración del fruto no hidrolizado.

5.2.2.2.1 Identificación del ácido clorogénico en el extracto acuso

obtenido por decocción del fruto no hidrolizado (EADF)

La comparación de los cromatogramas del estándar (negro), EADF (azul) y de la coelución de ambos (verde) (Figura 13) permitió identificar la presencia del ácido clorogénico con tiempo de retención de 14.29 min; dicha identidad se confirmó con los respectivos espectros UV (Figura 14).

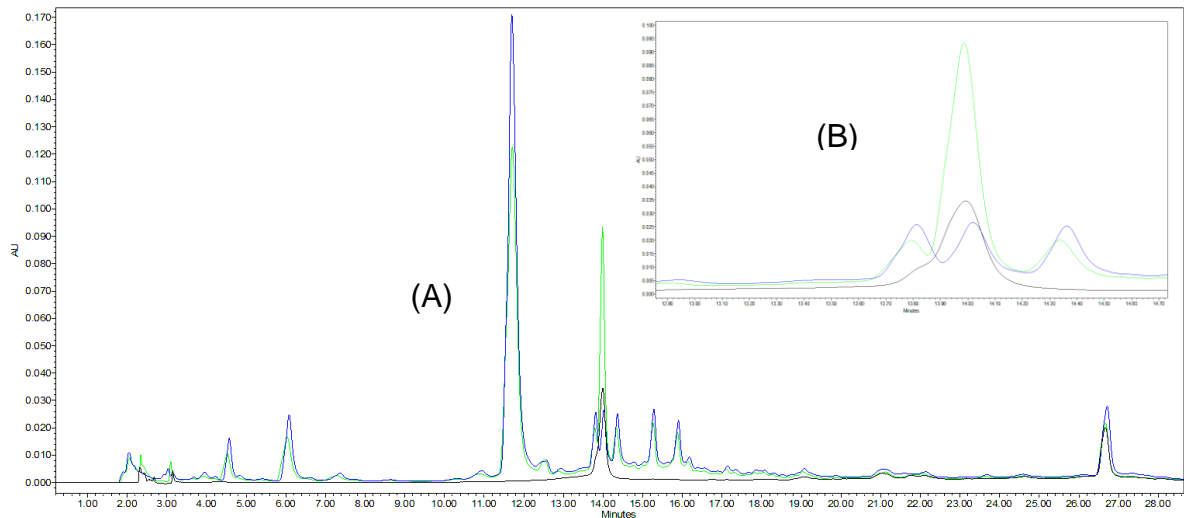


Figura 13. (A) Comparación de los cromatogramas de la ácido clorogénico (negro), del EADF (azul) y de la coelución (verde); (B) Ampliación de la zona entre 13.4 a 14.6 min.

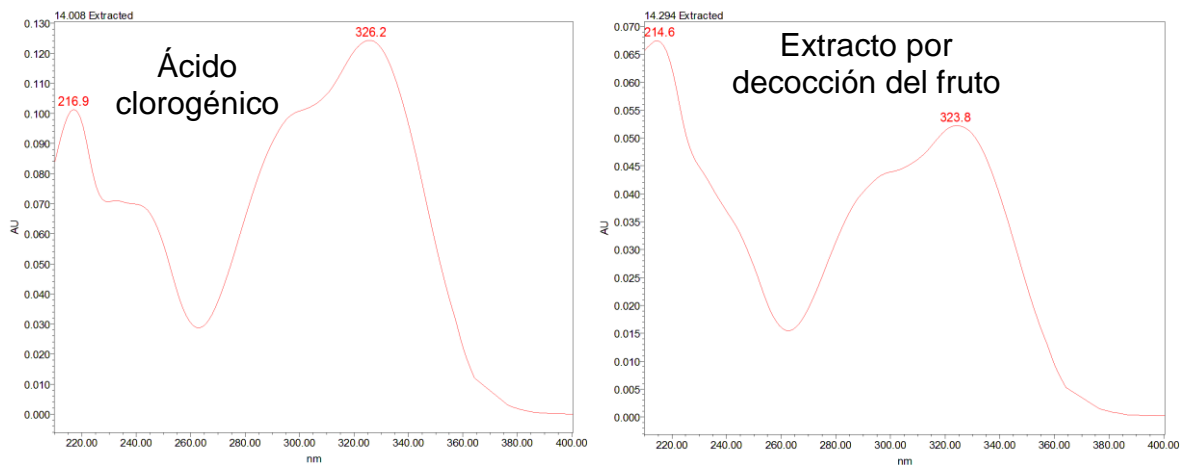


Figura 14. Espectros UV del ácido clorogénico puro (λ_{\max} 216.9 nm y 326.2 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EADF (λ_{\max} 214.6 nm y 323.8 nm).

5.2.2.2 Identificación del ácido clorogénico en el extracto acuoso obtenido por maceración del fruto no hidrolizado (EAMF)

La superposición del cromatograma del ácido clorogénico y del EAMF obtenido de *C. gracilior* (Figura 15) sugiere la posible presencia del ácido clorogénico con un tiempo de retención de 14.42 min; dicha presencia se confirma con los respectivos espectros UV (Figura 16).

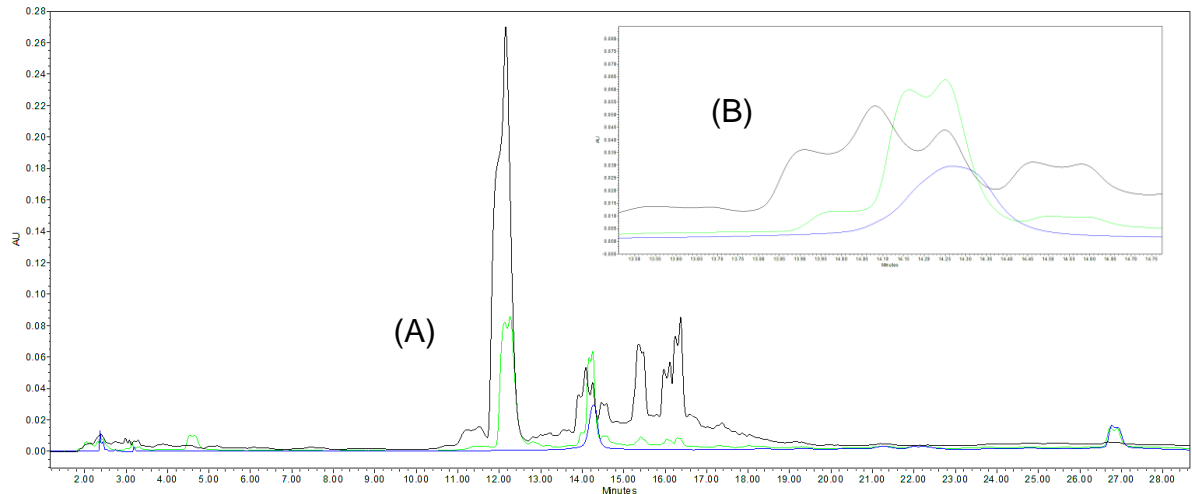


Figura 15. (A) Comparación de los cromatogramas del ácido clorogénico (azul), del EAMF (negro) y de la coelución (verde); (B) Ampliación de la zona entre 13.5 a 14.8 min.

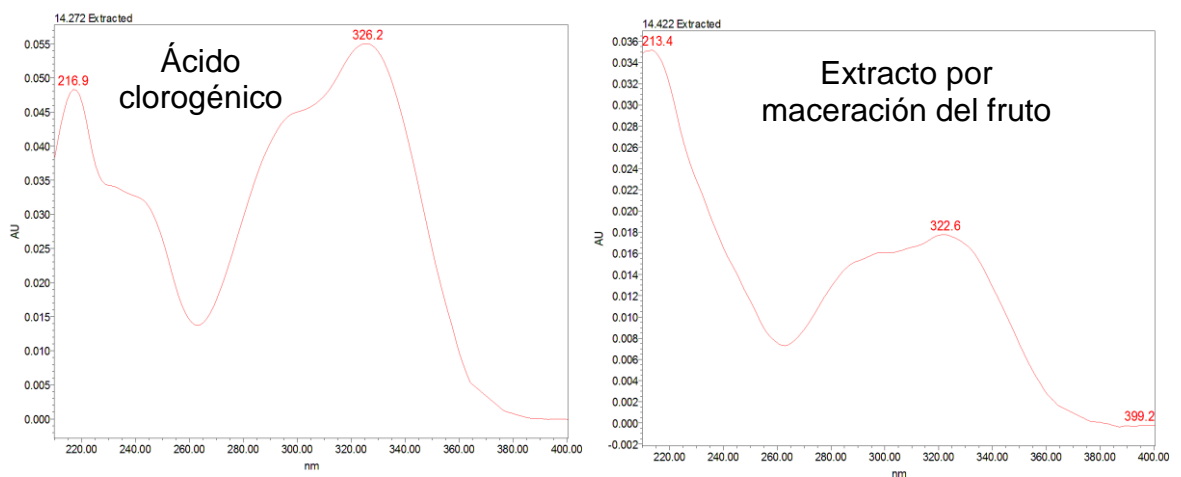


Figura 16. Espectros UV del ácido clorogénico puro (λ_{\max} 216.9 nm y 326.2 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EAMF (λ_{\max} 213.4 nm y 322.6 nm).

5.2.2.3 Compuestos identificados en el extracto metanólico hidrolizado en medio ácido (EMH)

En el EMH, se detectaron la (+)-catequina (Tr 14.55 min), la quercetina (Tr 22.81 min) y el kaempferol (Tr 21.15 min) (Figura 17).

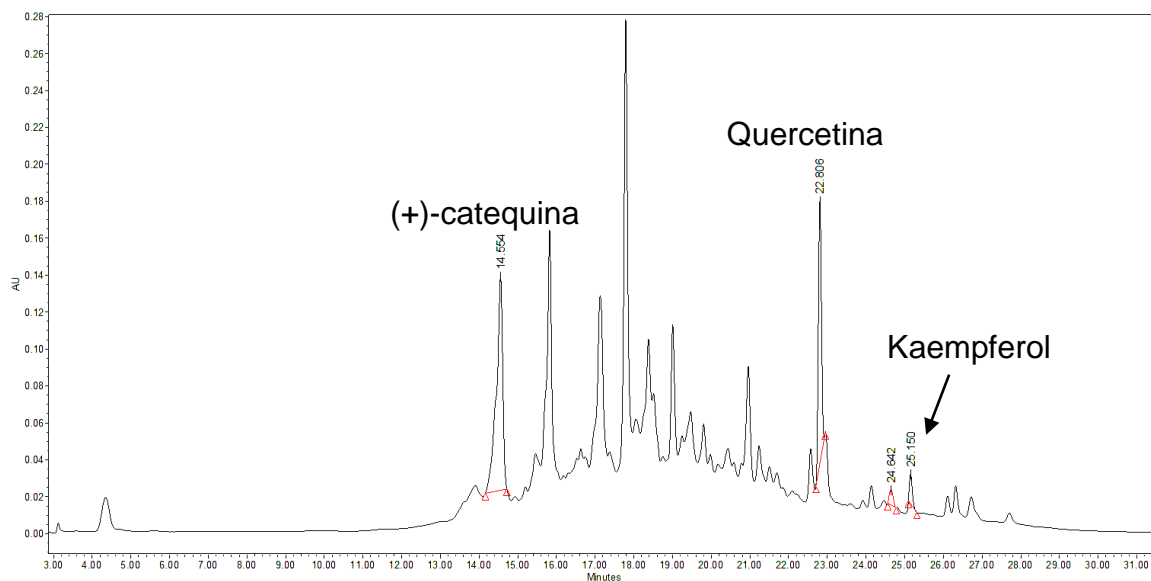


Figura 17. Cromatograma del extracto metanólico hidrolizado en medio ácido.

5.2.2.3.1 Identificación de la (+)-catequina

La comparación de los cromatogramas del estándar (azul), del EMH (negro) y de la coelución de ambos (verde) (Figura 18) permitió identificar claramente la presencia de la (+)-catequina, ya que se observó un incremento en la intensidad del pico con tiempo de retención de 14.61 min; dicha identidad se confirmó con los respectivos espectros UV (Figura 19).

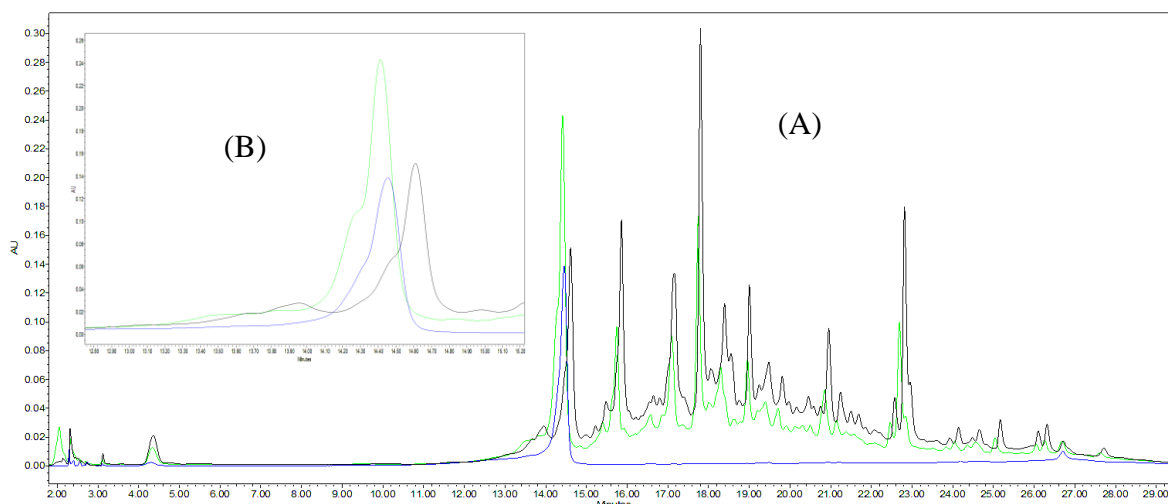


Figura 18. (A) Comparación de los cromatogramas de la (+)-catequina (azul), del EMH (negro) y de la coelución (verde); (B) Ampliación de la zona entre 12.8 a 15.2 min.

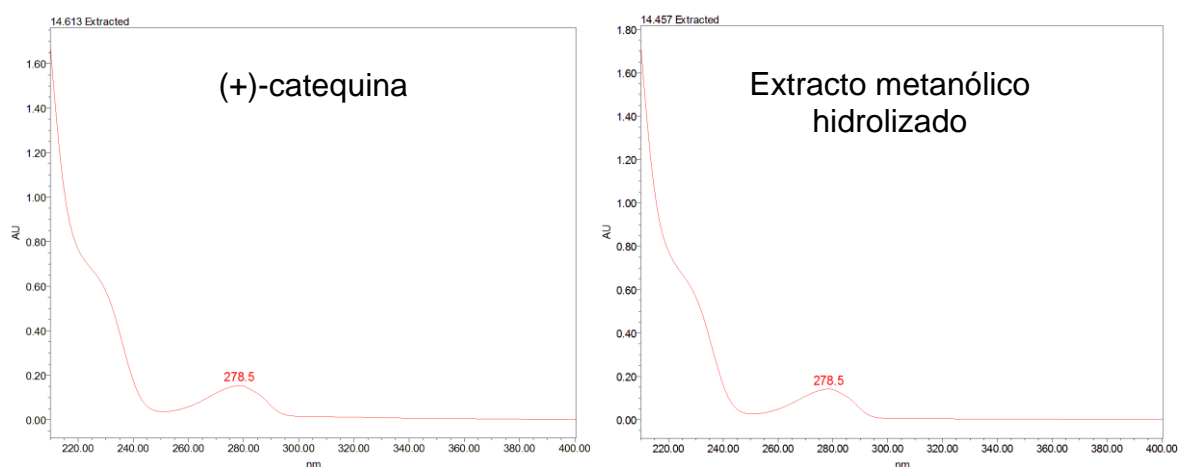


Figura 19. Espectros UV de la (+)-catequina (λ_{\max} 278.5 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ_{\max} 278.5 nm).

5.2.2.3.2 Identificación de la quercetina

La superposición del cromatograma de la mezcla de estándares y del EMH obtenido de *Crataegus gracilior* Phipps (Figura 20) sugiere la posible presencia de la quercetina con un tiempo de retención de 22.81 min. En la Figura 21, se muestran sus respectivos espectros UV.

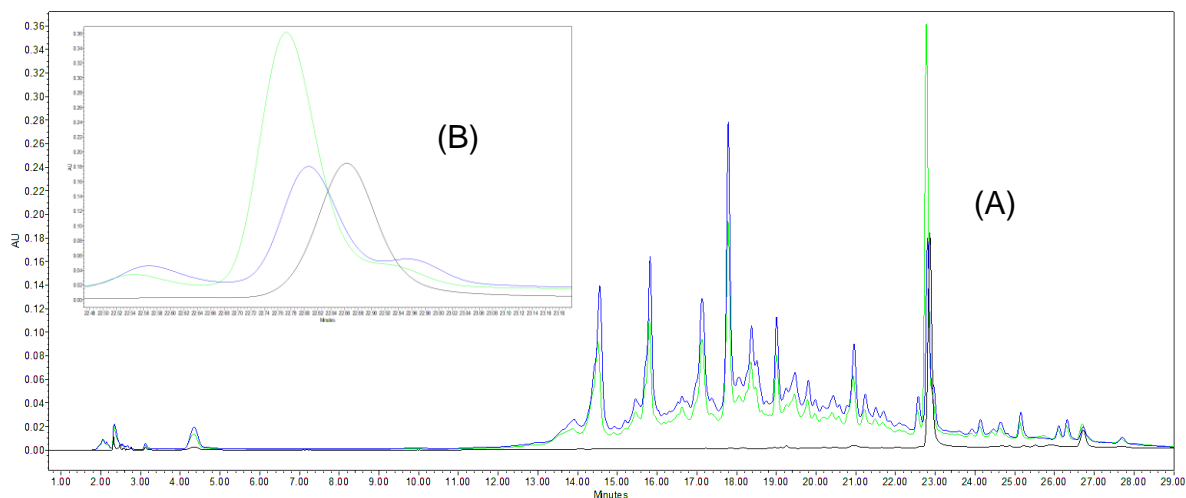


Figura 20. (A) Comparación de los cromatogramas de la quercetina (negro), del EMH (azul) y la coelución (verde); (B) Ampliación de la zona entre 22.5 a 23.2 min.

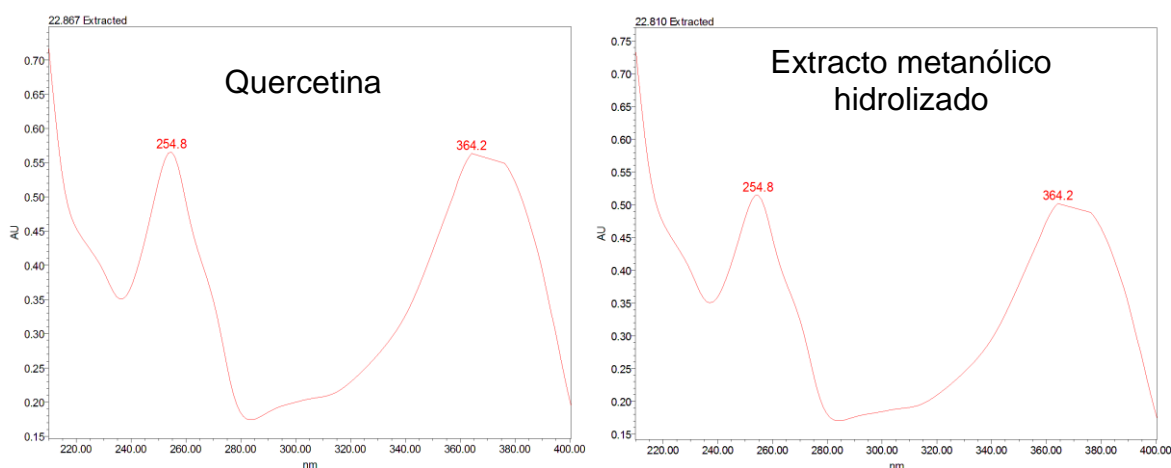


Figura 21. Espectros UV de la quercetina (λ_{\max} 254.8 nm y 264.2 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ_{\max} 254.8 nm y 264.2 nm).

5.2.2.3.3 Identificación del kaempferol

La superposición de los cromatogramas del estándar (azul), del EMH (negro) y la coelución de ambos (verde) (Figura 22) permitió identificar la presencia de este flavonoide, al observar el incremento en la intensidad del pico con tiempo de retención de 25.17 min que coincide con él del estándar, lo cual se confirmó con sus respectivos espectros UV (Figura 23).

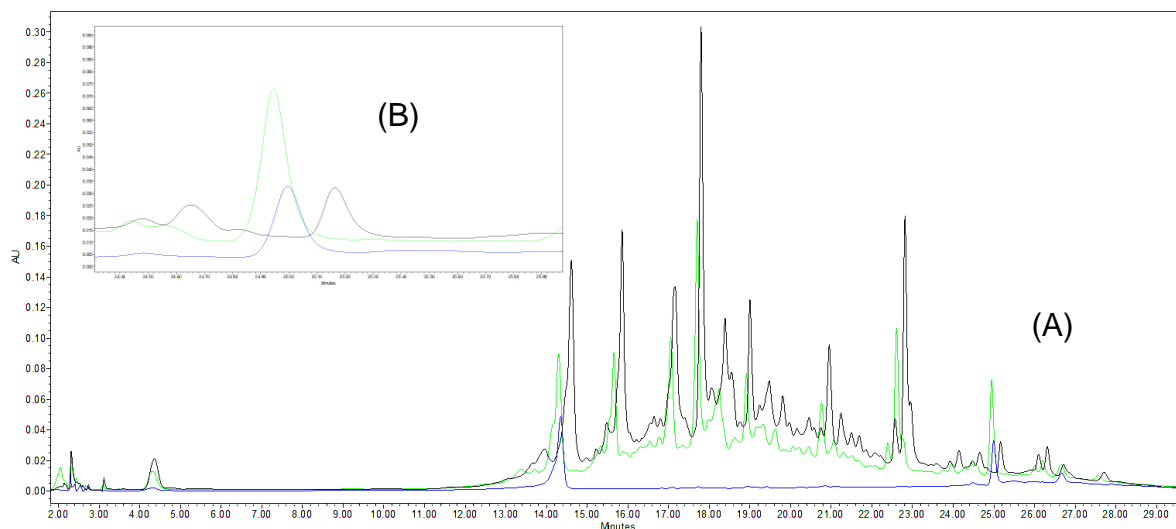


Figura 22. (A) Comparación de los cromatogramas del Kaempferol (azul), del EMH (negro) y de la coelución (verde); (B) Ampliación entre la zona de 24.4 a 25.9 min.

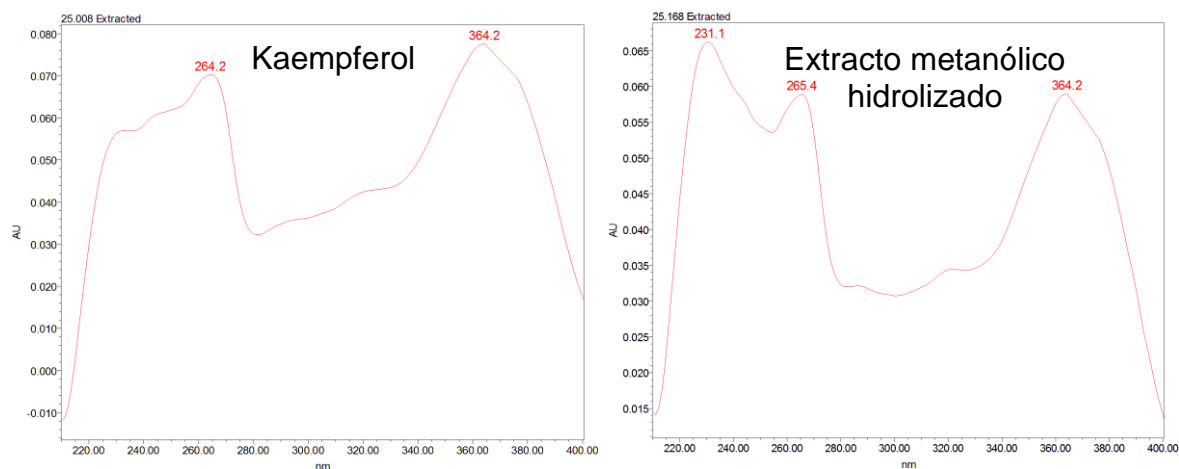


Figura 23. Espectros UV del kaempferol (λ_{\max} 264.2 nm y 364.2 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ_{\max} 265.4 nm y 364.2 nm).

5.2.2.4 Extracto metanólico hidrolizado en medio básico (EMB)

La superposición de los cromatogramas de la mezcla de estándares y el del metanólico hidrolizado en medio básico reveló la ausencia de los estándares disponibles (Figura 24).

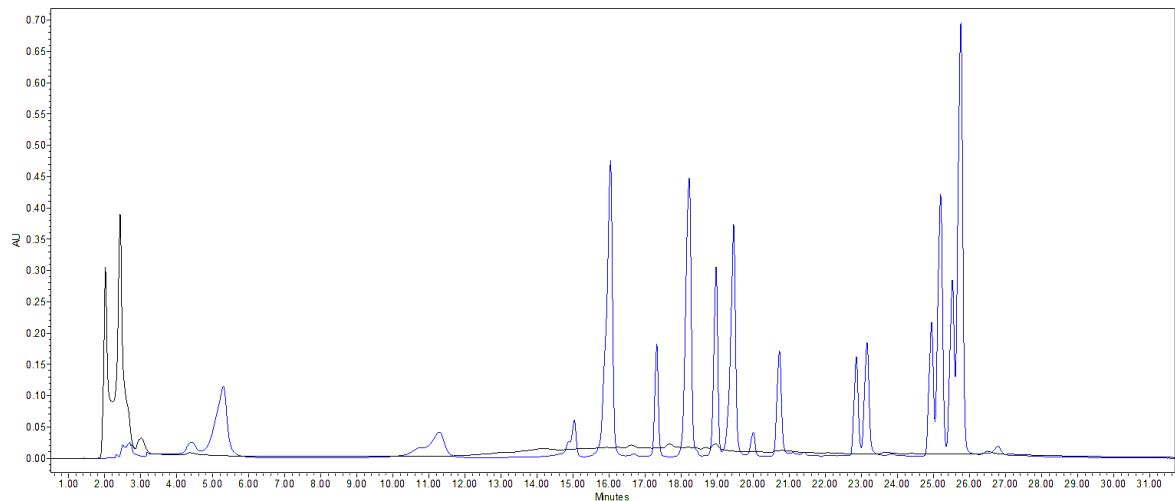


Figura 24. Cromatogramas de la mezcla de estándares (azul) y del EMB (negro).

5.2.2.5 Extractos acuosos del fruto hidrolizados en medio básico (EAFB) y en medio ácido (EAFH)

La superposición del cromatograma de la mezcla de estándares y los de los extractos acuosos obtenidos por decocción y por maceración de los frutos de *C. gracilior* y sometidos a hidrólisis reveló la ausencia de los estándares utilizados en este estudio (Figuras 25 y 26).

5.3 Cuantificación del ácido clorogénico y de la rutina identificados en el extracto metanólico no hidrolizado

Para la cuantificación de los compuestos encontrados en los diferentes extractos, se obtuvieron las siguientes curvas de calibración, de las cuales se dedujeron las ecuaciones lineales correspondientes ($y = ax + b$) que permitieron calcular los contenidos de compuestos fenólicos.

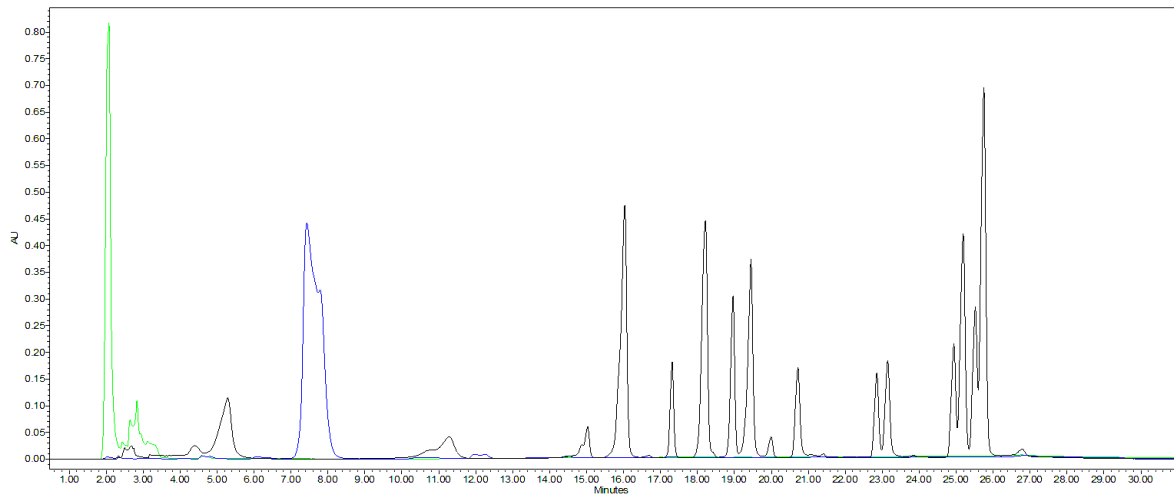


Figura 25. Cromatogramas de la mezcla de estándares (negro) y de la decocción del EAFH (azul) y del EAFB (verde).

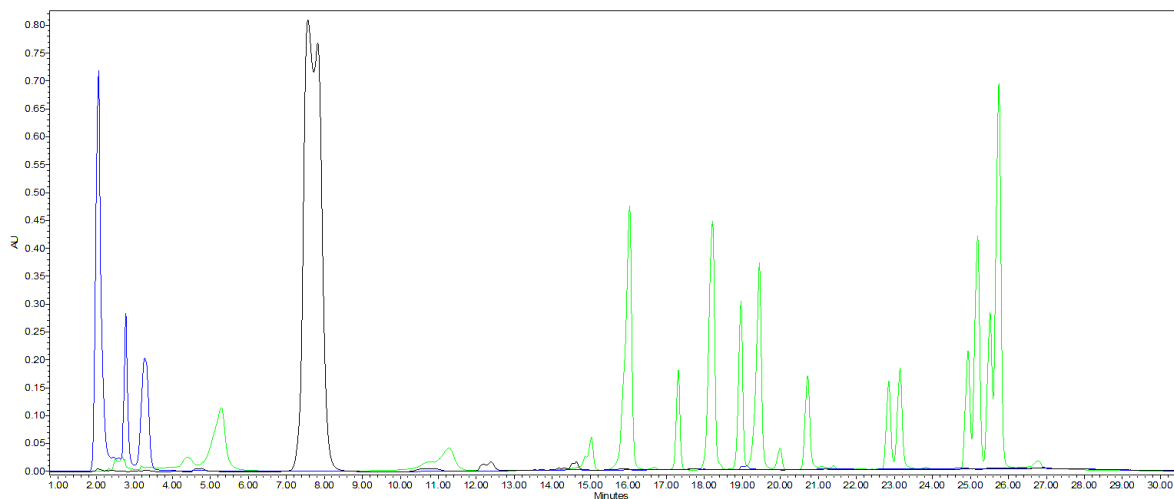


Figura 26. Cromatogramas de la mezcla de estándares (verde) y de la maceración del EAFH (negro) y del EAFB (azul)

5.3.1 Cuantificación del ácido clorogénico

La Figura 27 muestra la curva de calibración obtenida para la cuantificación del ácido clorogénico.

Ácido clorogénico	
Concentración (µg/µL)	Área bajo la curva
0.029	337453.33
0.015	162180.67
0.01	82890.33
0.007	62321.00

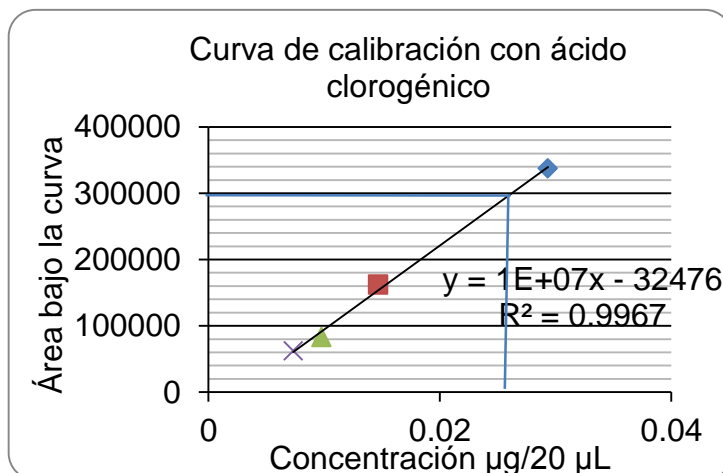


Figura 27. Curva de calibración realizada con el ácido clorogénico puro.

La sustitución del área experimental del pico (209747) identificado como ácido clorogénico en la ecuación deducida permitió calcular la concentración (x) de este ácido benzoico en el EM, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$x = (y + 32476) * 10^{-7} = 0.0242 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$$

Con este dato obtenido, se calculó la concentración que se tendrá en 800 µL de la solución del EM, los cuales se prepararon a partir de 3.8 mg de dicho extracto. El cálculo que se efectuó fue el siguiente:

$$800 \mu\text{L} (0.0242 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}) = 0.9689 \mu\text{g}$$

Dado que esos 800 µL se prepararon a partir de 3.8 mg de extracto metanólico, se realizó el cálculo para saber qué cantidad de ácido clorogénico se tiene en el extracto metanólico concentrado total, ya que el total del extracto que se obtuvo del material vegetal fue 224.60 g. El resultado es:

$$(224,600 \text{ mg} * 0.9689 \mu\text{g})/3.8 \text{ mg} = 57,266.62 \mu\text{g}$$

Por ultimo, se hizo el cálculo para determinar la cantidad de ácido clorogénico por gramo de material vegetal seco, ya que para el extracto metanólico, se pesaron 1630.3 g. El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(1 \text{ g} * 57,266.62 \text{ } \mu\text{g})/1630.3 \text{ g} = 35.13 \text{ } \mu\text{g}$$

De acuerdo con los cálculos realizados, se deduce que la concentración de ácido clorogénico es de 0.03513 mg/g de material vegetal seco (MVS).

5.3.2 Cuantificación de la rutina

Para determinar la concentración de la rutina en el material vegetal seco (hojas secas) de *Crataegus gracilior* Phipps, se realizó su respectiva curva de calibración en donde se obtuvo el área bajo la curva para este pico y su correspondiente curva de calibración con su respectiva ecuación lineal, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para determinar la concentración de la rutina (Figura 28). De este modo, la concentración de la rutina fue de 300.80 $\mu\text{g/g}$ MVS.

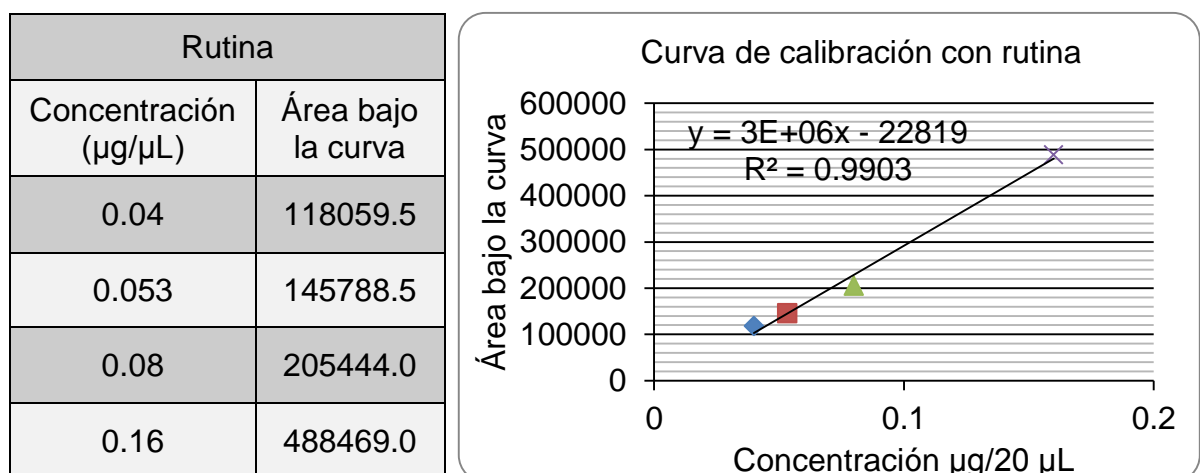


Figura 28. Curva de calibración realizada con la rutina pura.

5.4 Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en el EMH

5.4.1 Cuantificación de la (+)-catequina

La Figura 29 muestra la curva de calibración obtenida para la cuantificación de la (+)-catequina.

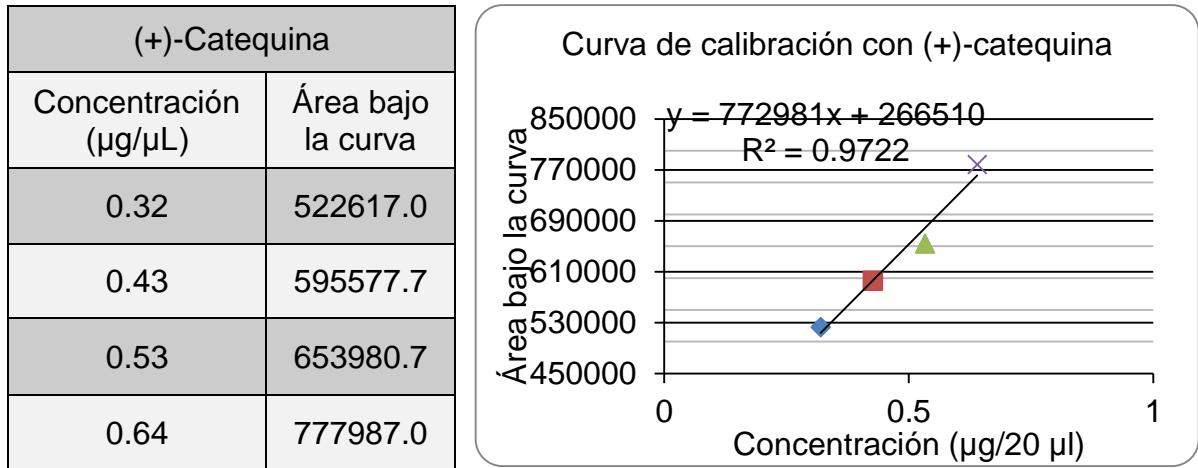


Figura 29. Curva de calibración realizada con la (+)-catequina pura.

La sustitución del área experimental del pico (599753) identificado como (+)-catequina en la ecuación deducida permitió calcular la concentración (x) de este flavonoide en el EMH, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$x = (y - 266510)/772981 = 0.4311 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$$

Con este dato obtenido, se calculó la concentración que se tendrá en 25 mL (25,000 µL) de la solución del EMH, los cuales se prepararon a partir de 103.4 mg de dicho extracto. El cálculo que se efectuó fue el siguiente:

$$25,000 \mu\text{L} (0.4311 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}) = 538.875 \mu\text{g}$$

Dado que esos 25 mL se prepararon a partir de 103.4 mg de extracto metanólico, se realizó el cálculo para saber qué cantidad de (+)-catequina se

tiene en los 224.6 g de extracto metanólico concentrado total obtenido del material vegetal original:

$$(224,600 \text{ mg} * 538.875 \text{ } \mu\text{g})/103.4 \text{ mg} = 1,170,515.72 \text{ } \mu\text{g}$$

Por último, se hizo el cálculo para determinar la cantidad de (+)-catequina por gramo de material vegetal seco. El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(1 \text{ g} * 1,170,515.72 \text{ } \mu\text{g})/1630.3 \text{ g} = 717.98 \text{ } \mu\text{g}$$

De acuerdo con los cálculos realizados, se puede decir concretamente que la concentración de (+)-catequina es de 0.7179 mg/g de material vegetal seco.

5.4.2 Cuantificación de la quercetina

Siguiendo el mismo procedimiento, la cantidad de quercetina fue calculada con la sustitución del área bajo la curva para este pico en la ecuación lineal obtenida de su respectiva curva de calibración (Figura 30), dando como resultado una concentración de 134.3 $\mu\text{g/g}$ MVS para la quercetina.

Quercetina	
Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Área bajo la curva
0.017	112879.5
0.033	225749.5
0.067	458554
0.13	988469

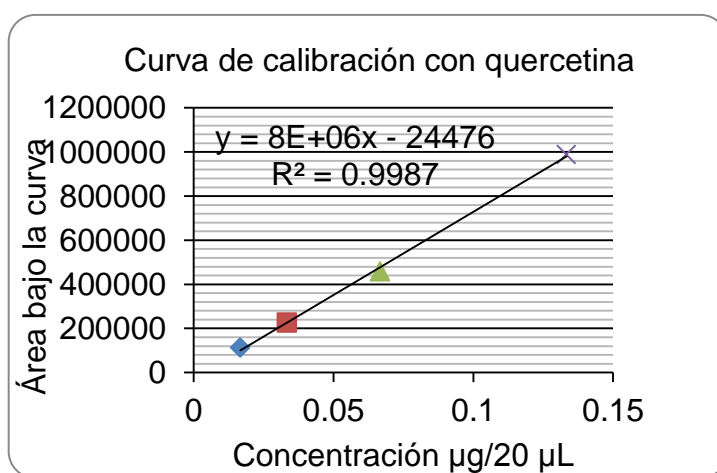


Figura 30. Curva de calibración realizada con la quercetina.

5.4.3 Curva de calibración del kaempferol

La concentración del kaempferol fue calculada siguiendo el mismo procedimiento usado para determinar la concentración del ácido clorogénico, usando el área bajo la curva. De este modo, la concentración del kaempferol fue de 8.64 µg/g MVS (Figura 31).

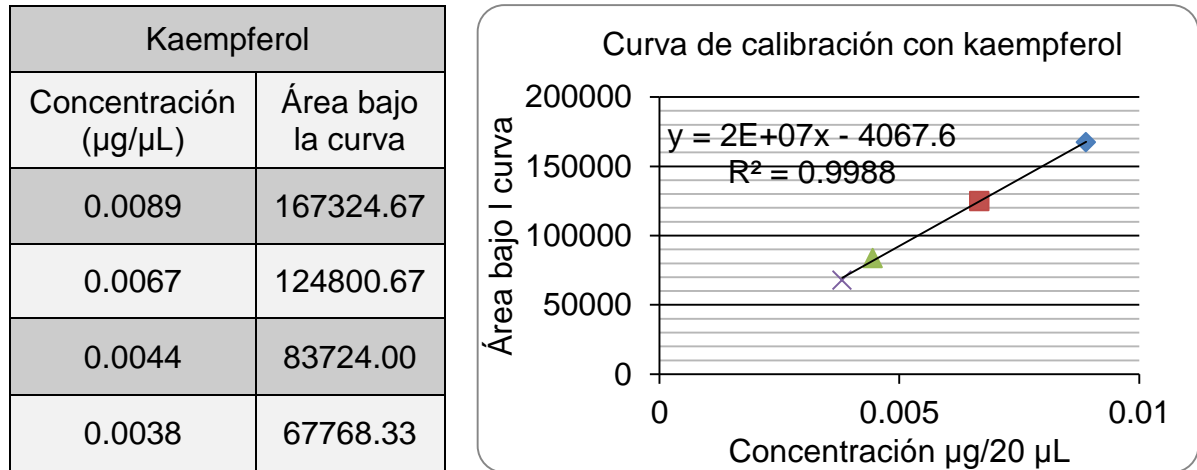


Figura 31. Curva de calibración realizada con el kaempferol.

5.5 Cuantificación del ácido clorogénico en los extractos obtenidos por decocción y por maceración del fruto no hidrolizados

5.5.1 Cuantificación de ácido clorogénico en el EADF

Para determinar la concentración del ácido clorogénico en el material vegetal seco de *Crataegus gracilior* Phipps, se obtuvo el área bajo la curva para este pico y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para su cuantificación, utilizando la misma curva de calibración que ya se tenía para la cuantificación del ácido clorogénico en el EADF. De este modo, la concentración de ácido clorogénico fue de 3.33 µg/g MVS.

5.5.1 Cuantificación de ácido clorogénico en el EAMF

El ácido clorogénico no pudo ser cuantificado en este extracto debido a que se encontraba en muy pequeñas cantidades por lo que se puede decir que éste estaba sólo en trazas.

6. DISCUSIÓN

6.1 Identificación y cuantificación de algunos de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

Existe una gran cantidad de compuestos fenólicos en los diferentes órganos de las plantas, por consiguiente, es prácticamente imposible disponer de tantos estándares, no sólo por su gran número, sino porque además sólo se vende un número muy limitado de ellos, los más comunes en la naturaleza. Como puede apreciarse en los cromatogramas generados por los diferentes extractos, éstos mostraron una gran complejidad en su composición química. Debido a que el análisis se llevó a cabo en las condiciones de resolución de la mezcla de los estándares utilizados, muchos de los constituyentes no identificados pudieran ser también compuestos fenólicos.

Según los resultados, el extracto que tuvo mayor contenido de flavonoides fue el metanólico de las hojas, mientras que en los extractos no hidrolizados obtenidos por decocción y por maceración del fruto, sólo se identificó el ácido clorogénico. Cabe mencionar que en el extracto metanólico no hidrolizado, se detectó la rutina y el ácido clorogénico, mientras que en el extracto metanólico hidrolizado en medio ácido, se logró identificar tres flavonoides: (+)-catequina, quercetina (aglicona de la rutina) y kaempferol. Otros picos no detectados en el extracto no hidrolizado aparecieron después de la hidrólisis ácida, aunque ninguno pudo ser identificado debido al número limitado de estándares disponible. Esto sugiere que varios de los flavonoides presentes en los extractos se encuentran en forma de glicósidos.

De los dos estándares identificados en el extracto metanólico no hidrolizado, el más abundante fue la rutina con una concentración igual a 0.30 mg/g MVS, mientras que la (+)-catequina, uno de los tres compuestos encontrados en el EMH, fue la más abundante con una proporción de 0.7179 mg/g MVS. Por otro lado, en los extractos obtenidos por decocción y por maceración del fruto, sólo se identificó el ácido clorogénico, logrando su

cuantificación solamente en el extracto obtenido por decocción del fruto con un valor de 0.0033 mg/g MVS.

El Cuadro 4 resume los compuestos fenólicos identificados en el extracto metanólico de las hojas y en los extractos obtenidos por decocción y por maceración del fruto de *C. gracilior*.

Cuadro 4. Resumen de los compuestos fenólicos identificados y algunos de sus datos analíticos.

		COMPUESTO	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Cantidad Obtenida(μ g)/g de hoja seca
Extractos no hidrolizados	Metanólico de las hojas	Rutina	17.23	254.8 y 353.7	300.8
		Ácido clorogénico	13.99	325	35.1
	Decocción del fruto	Ácido clorogénico	14.29	214.6 y 323.8	3.3
	Maceración del fruto	Ácido clorogénico	14.42	213.4 y 322.6	NO CUANTIFICADO
Extracto metanólico hidrolizado en medio ácido		(+)-Catequina	14.61	278.5	717.9
		Quercetina	22.810	254.8 y 264.2	134.3
		Kaempferol	21.168	265.4 y 364.2	8.6

6.2 Actividades farmacológicas de los compuestos fenólicos identificados

Los flavonoides encontrados tienen propiedades medicinales ya descritas en múltiples estudios donde han sido utilizados para tratar diferentes enfermedades como úlceras, inflamación, cáncer, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y trombosis, entre otras (Sandhar y col., 2011).

Las investigaciones de compuestos químicos del género *Crataegus* se han centrado en la mayoría de los casos en la identificación y cuantificación de

los flavonoides y las antocianinas que han demostrado tener actividad farmacológica, como se indica en una revisión publicada recientemente por Edwards y col. (2012). En esta revisión, se hace una relación de una serie de estudios químicos que abarcan un total de 27 diferentes especies del género *Crataegus* y dos híbridos nativos de Europa, Asia y América del Norte. Se recopiló información del contenido de flavonoides totales presentes en las hojas, frutos y flores de las diferentes especies del género *Crataegus*. En esos estudios, se reporta la presencia de la quercetina en hojas, flores y frutos de algunas de las especies. En el presente trabajo, sólo se encontró este flavonoides en el extracto metanólico de las hojas, pero no en los frutos. Todos esos compuestos tienen actividades benéficas sobre la salud.

Para el kaempferol por ejemplo, se han comprobado actividades anticancerígenas, antimicrobianas, bactericidas, antiinflamatorias, así como el papel tan importante que tiene éste en enfermedades cardiovasculares, cerebrales y el rol que juega en la prevención de la aterosclerosis y la oxidación de las lipoproteínas (Wu-Yang y col., 2010; Calderón-Montaña y col., 2011). Estos estudios han relacionado expresamente la cantidad de kaempferol consumida al día con la disminución de cáncer en una población de 433 personas, donde se menciona que una cantidad de entre 0.8 y 1.2 mg de kaempferol consumido al día disminuye relativamente el cáncer de próstata y de colón (Calderón-Montaña y col., 2011). Estos estudios muestran la importancia de los compuestos fenólicos, entre ellos el kaempferol, para el tratamiento de diversas enfermedades.

La rutina por su parte posee actividades vasodilatadoras, antiinflamatorias e inmunoestimulantes, así como efecto protector contra un procarcinógeno (Cristina Marcarini y col., 2011), donde se encontró una reducción significativa del daño inducido al DNA. En base a esas evidencias, podemos decir que la rutina es de gran interés medicinal.

Los efectos más relevantes encontrados para el ácido clorogénico incluyen su actividad antiangiogénica (Kwon y col., 2010) y antihipertensiva (Zhao y col., 2012). Entre las actividades biológicas relevantes del ácido clorogénico, destaca su actividad antiangiogénica (Kwon y col., 2010) y la antihipertensiva (Zhao y col., 2012).

Destaca el hecho de que ninguno de los ácidos fenólicos buscados en la presente investigación estuvo presente en al menos alguno de los extractos.

7. CONCLUSIONES

Con la realización de este proyecto, se puede concluir que la especie *Crataegus gracilior* contiene compuestos fenólicos, principalmente en forma de glicósidos, muy importantes que justifican su aplicación medicinal.

Los flavonoides que se detectaron en el extracto metanólico de las hojas de *Crataegus gracilior* sometido a hidrólisis ácida fueron (+)-catequina, quercetina y kaempferol, de los cuales la (+)-catequina fue el flavonoide más abundante, mientras que en el extracto metanólico no hidrolizado se identificaron la rutina y el ácido clorogénico. En los extractos obtenidos por decocción y por maceración del fruto se logró detectar el ácido clorogénico.

La especie *Crataegus gracilior* no sólo contiene los cuatro flavonoides mencionados anteriormente, puede ser que algunos de los picos generados en los cromatogramas por cada uno de los diferentes extractos analizados sean compuestos fenólicos que no corresponden a los estándares utilizados.

La escasez de compuestos fenólicos en los frutos justifican el por qué las hojas tienen mayor uso en la terapéutica tradicional.

8. REFERENCIAS

Abd El-Hady D. Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)-catechin in some commercial drinks and biological fluids. *Anal Chim Acta* **2007**;593:178-187.

Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffness of aging and diabetes. *J Hypertens* **2003**;21:3-12.

Ayatollahi SAM, Kobarfard F, Asgarpanah J, Choudhary MI. Antiglycation Activity of *Otostegia persica* (Burm.) Boiss. *Afr J Biotechnol* **2010**;9:3645-3648.

Borissova P, Valcheva St, Belcheva A. Antiinflammatory effect of flavonoids in the natural juice from *Aronia melanocarpa*, rutin and rutin-magnesium complex on an experimental model of inflammation induced by histamine and serotonin. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* **1994**;20:25-30.

Budzianowski J, Pakulski G, Robak J. Studies on the antioxidative activity of some C-glycosylflavones. *Pol J Pharmacol Pharm* **1991**;43:395-401.

Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A Review on the Dietary Flavonoid kaempferol. *Med Chem.* **2011**;11:298-344

Chen S, Wang Y, Luo L. Advances in research on chlorogenic acid. *Shipin Keji (Abstract)* **2008**;2:195-199.

Chi-Hao W, Chi-Tai Y, Ping-Hsiao S, Gow-Chin Y. Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 β activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. *Mol Nutr Food Res* **2010**;54(Suppl. 2):S127-S140.

Chin-Lin H, Gow-Chin Y. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* **2008**;52:53-61.

Closa D, Folch-Puy E. 2004. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 56: 185-91.

Cristina Marcarini J, Ferreira Tsuboy MS, Cabral Luiz R, Regina Ribeiro L, Beatriz Hoffmann-Campo C, Sérgio Mantovani M. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Toxicol Pathol* **2011**;63:459-465.

Cushnie, TPT, Lamb, AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* **2005**;26:343-356.

Del Rio D, Stalmach A, Calani L, Crozier A. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients* **2010**;2:820-833.

Duffy SJ, Vita JA. Effects of phenolics on vascular endothelial function. *Curr Opin Lipidol* **2003**;14:21-27.

Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* **2012**;79:5-26.

Fong-Harry HS, Bauman JL. Hawthorn. Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, USA. *J Cardiovasc Nurs* **2002**;16:1-8.

[Gaitán I](#), [Paz AM](#), [Zacchino SA](#), [Tamayo G](#), [Giménez A](#), [Pinzón R](#) y col. Subcutaneous antifungal screening of Latin American plant extracts against *Sporothrix schenckii* and *Fonsecaea pedrosoi*. *Pharma Biol* **2011**;49(9):907-19.

Grace MH, Wilson GR, Kandil FE, Dimitriadis E, Coates RM. Characteristic flavonoids from *Acacia burkittii* and *A. acuminata* heartwoods and their differential cytotoxicity to normal and leukemia cells. *Nat Prod Comm* **2009**;4:69-76.

Grael CFF, Kanashiro A, Kabeya L, Jordan C, Takeara R, Gobbo-Neto L y col. In vitro study of antioxidant and scavenger properties of phenolic compounds from *Lychnophora* species. *Quim Nova* **2010**;33:867-870.

Harnafi H, Amrani S. Flavonoids as potent phytochemicals in cardiovascular diseases prevention. *Phcog Rev* **2007**;1(2):193-202.

Jiang F, Disting-G J. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Curr Vasc Pharmac* **2003**;1:135-156.

Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Yin YF, Wang CP, Tseng TH. 2005. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 53: 430-6.

Kielland A, Blom T, Nandakumar KS, Holmdahl R, Blomhoff R, Carlsen H. 2009. *In vivo* imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radical Bi. Med* 47: 760-6.

Kim JS, Kim IH. Pharmac constituents of *Crataegus pinnatifida* var. *pubescens* leaves. Yakhak Hoechi (Abstract) **1993**;37:193-197.

Kocylidiz ZC, Birman H, Olgac V, Akgun-Dar K, Melikoglu G, Mericli AH. *Crataegus tanacetifolia* leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. Phytother Res **2006**;20:66-70.

Kovalyova AM, Sydora NV, Komisarenko AM, Honcharov MF. Polyphenols in leaves of *Crataegus* species. Medichna Khimiya (Abstract) **2008**;10:110-112.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF y col. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med **2002**;113(9B):71S-88S.

Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim HC, Jo TH, Park YI, Lee CK, Kim YB, Lee SY, Jang CG. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. Eur J Pharmacol **2010**;649:210-7.

Liu JG, Xie YM, Deng WL, Xu Z. Experimental study on anti-inflammation effect of assemble flavonoids of rhizoma drynariae. Zhongguo Tianran Yaowu (Abstract) **2004**;2(4):232-234.

Lopez-Lazaro M. Flavonoids as anticancer agents: Structure-activity relationship study. Curr Med Chem **2002**;2:691-714.

Melikoglu G, Bitis L, Mericli AH. Flavonoids of *Crataegus microphylla*. Nat Prod Res **2004**;18:211-213.

Mericli AH, Melikoglu G. Investigations on Turkish *Crataegus* species. Acta Pharma Turcica **2002**;44:169-173.

Mojzisova G, Mojzis J. Flavonoids and their potential health benefits: relation to heart diseases and cancer. Recent Prog Med Plants **2008**;21:105-129.

Moline J, Bukharovich IF, Wolff MS, Phillips R. Dietary flavonoids and hypertension: Is there a link?. Med Hypotheses **2000**;55(4):306-309.

Mulvihill EE, Huff MW. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. Can J Cardiol **2010**;26(Suppl. A):17A-21A.

Nikolov N, Nauchnoizsled K. Flavonoid composition of *Crataegus monogyna*. IV. Kaempferol, vitexin, saponaretin, and a crystalline isomorphous mixture of rutin and quercetin-3-O-rhamnogalactoside from leaves and flowers. Farmatsiya (Sofia, Bulgaria) **1973**;23:3-5.

- Nikolov** N, Seligmann O, Wagner H, Horowitz RM, Gentili B. New flavonoid-glycosides from *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* W. et K. *Planta Med* **1982**;44:50-53.
- Núñez-Colín** CA, Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego AF, Segura S, Sahagún-Castellanos J, González-Andrés F. Distribución y caracterización ecolimática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, SUBFAM. Maloideae) en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* **2008**;14(2):177-184.
- Oomah** BD, Corbe A, Balasubramanian P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *J Agric Food Chem* **2010**;58:8225-8230.
- Panthong** A, Kanjanapothi D, Tuntiwachwuttikul P, Pancharoen O, Reutrakul V. Antiinflammatory activity of flavonoids. *Phytomedicine* **1994**;1(2):141-4.
- Peng-Gao** L, Jin-Wen X, Katsumi I, Akira K, Yasuyo K, Takahiko M y col. Caffeic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* **2005**;28:369-7.
- Petri** G, Kery A, Krawczyk U, Herenyi B, Vadasz A.A. Flavonoids and procyanidins in *Crataegus* species. *Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols* **1988**;14:115-118.
- Phipps** JB, O'Kennon RJ, Lance RW. Hawthorns and medlars. Royal Horticultural Society. *Plant Collection Guide*. Portland, USA: Editorial Timber Press, **2003**:139.
- Phipps** JB. Monographs of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, subfam. Maloideae). *SIDA Botanical Miscellany*, **1997**;15:1-94.
- Prinz** S, Ringl A, Huefner A, Pemp E, Kopp B. 4''-Acetylxitoxin-2''-O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). *Chem Biodivers* **2007**;4:2920-2931.
- Reuter** S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Radical Bio Med* **49**: 1603-1616.
- Román-Ramos** R, Alarcón-Aguilar F, Lara-Lemus A, Flores-Saenz JL. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch Med Res* **1992**;23:59-64.

Rzedowski J, Calderon-de-Rzedowski G. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Pátzcuaro, Michoacán, México: Editorial INECOL Instituto de Ecología A.C, **2005**;fascículo 135:48-54.

Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Inter Pharm Sciencia* **2011**;1(1):25-41.

Schüssler M, Holz J, Fricke U. Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species. *Arzneimittelforschung* **1995a**;45:842-845.

Schüssler M, Holz J, Rump AF, Fricke U. Functional and antiischaemic effects of Monoacetyl-vitexinrhamnoside in different *in vitro* models. *Gen Pharmacol* **1995b**;26:1565-70.

Serrano V, Sánchez F, Pelz R. Recetario Plantas Medicinales de Amealco. Querétaro: Impresos Casablanca **1992**; 46.

Shan, Jun-jie, Zhang, Min, Wu, Chun-mi, Zhang, Xin-yu. Advances in the research of active flavonoids for the treatment of diabetes and its complications. *Zhongguo Xinyao Zazhi (Abstract)* **2008**;17(12):998-1006.

Sharma VJ, Shah UD. Antihyperglycemic activity of flavonoids from methanolic extract of aerial parts of *Scoparia dulcis* in streptozotocin induced diabetic rats. *Intern J Chem Tech Res* **2010**;2(1):214-218.

Shukla S, Gupta S. Dietary agents in the chemoprevention of prostate cancer. *Nutr Cancer* **2005**;53:18-32.

Shun-Fa Y, Wen-En Y, Wu-Hsien K, Horng-Rong C, Shu-Chen C, Yih-Shou H. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol* **2008**;53:287-294.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation endproducts: a review. *Diabetologia* **2001**;44:129-146.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res* **2005**;579: 200-213.

Weyant MJ, Carothers AM, Dannenberg AJ, Bertagnolli MM. (+)- Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the Min/+ mouse. *Cancer Res* **2001**;61:118-125.

Wu-Yang H, Yi-Zhong C, Yanbo Z. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* **2010**;62(1):1-20.

Yonathan M, Asres K, Assefa A, Bucar F. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. *J Ethnopharm* **2006**;108:462-470.

Zhao Y, Wang J, Balleve O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens Res* **2012**;35(4):370-4.