

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE
FRUTOS Y HOJAS DE *Crataegus mexicana* DC.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ABIGAIL HERNÁNDEZ PÉREZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE
FRUTOS Y HOJAS DE *Crataegus mexicana* DC.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ABIGAIL HERNÁNDEZ PÉREZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH_

DIRECTOR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODAL

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODAL

Dra. LAURA BERUMEN SEGURA

SINODAL

RESUMEN

El uso de los frutos de las especies vegetales del género *Crataegus* (tejocotes) en dulces, ponches y otras bebidas está muy extendido en México. Las hojas por su parte gozan de reputación a nivel mundial para tratar diversas enfermedades, entre las cuales destacan las cardiovasculares, ya que sus extractos estabilizan la presión arterial. Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la prevención y el tratamiento de dichos padecimientos, principalmente debido a su capacidad antioxidante. Teniendo en cuenta que esas plantas se consumen como extractos, o sea como mezclas complejas de compuestos polares que se obtienen por infusión con etanol y/o agua o por decocción con esos disolventes, la presente propuesta consistió en evaluar la capacidad antioxidante de los extractos e identificar algunos de los constituyentes fenólicos que pudieran ser los responsables de esta actividad farmacológica. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto metanólico de las hojas contiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos que los extractos de los frutos. Así mismo los extractos con mayor cantidad de compuestos fenólicos produjeron un mayor efecto antioxidante. El análisis del extracto obtenido de las hojas, utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (UV) y estándares fenólicos, permitió identificar cuatro flavonoides: la rutina, la quercetina, el kaempferol y la (+)-catequina, esta última siendo mayoritaria. Ninguno de los estándares empleados estuvo presente en los extractos acuosos de los frutos frescos, de tal suerte que su beneficio sobre la salud puede estar relacionado con otros tipos de metabolitos.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	
1.1 Las plantas medicinales en la terapéutica	1
1.2 El género <i>Crataegus</i>	2
1.3 Características botánicas y nombres comunes de <i>Crataegus mexicana</i>	3
1.4 Estudios farmacológicos efectuados con especies del género <i>Crataegus</i>	4
1.5 Antecedentes químicos de especies de <i>Crataegus</i>	4
1.6 Compuestos fenólicos comunes en plantas	5
1.6.1 Fenoles simples y fenilpropanoides	5
1.6.2 Flavonoides y estilbenos	6
1.6.3 Policétidos aromáticos	8
1.7 Importancia biológica de los compuestos fenólicos	8
1.7.1 Estudios epidemiológicos	8
1.7.2 Actividades farmacológicas de algunos compuestos fenólicos	9
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales	13
4.1.1 Material de estudio	13
4.1.2 Equipos	13

4.1.2.1	Procesamiento del material vegetal	13
4.1.2.2	Procesamiento de los extractos	13
4.1.2.3	Análisis de los extractos	13
4.2	Métodos	14
4.2.1	Preparación de los extractos	14
4.2.1.1	Extracto metanólico	14
4.2.1.2	Extractos acuosos	14
4.2.2	Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	14
4.2.3	Determinación de flavonoides	14
4.2.4	Evaluación de la capacidad antioxidante	15
4.2.4.1	Ensayo DPPH	15
4.2.4.2	Ensayo FRAP	15
4.2.5	Análisis de fenoles individuales	16
4.2.6	Hidrólisis ácida de los extractos	16
4.2.7	Hidrólisis básica de los extractos	17
4.2.8	Condiciones en HPLC	17
4.2.9	Identificación de los compuestos fenólicos	18
4.2.10	Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados	18
5.	RESULTADOS	19
5.1	Preparación de los extractos	19
5.2	Actividad antioxidante de los extractos preparados	19
5.3	Determinación de fenoles totales y flavonoides por el método de Folin-Ciocalteu	20
5.4	Identificación de los compuestos fenólicos	20
5.4.1	Determinación de los tiempos de retención de los estándares	20
5.4.2	Análisis de las muestras	21
5.4.2.1	Identificación de la rutina en el extracto metanólico no hidrolizado	21
5.4.2.2	Extractos acuosos no hidrolizados del fruto	22
5.4.2.3	Compuestos identificados en el extracto metanólico hidrolizado en medio ácido (EMH)	23

5.4.2.3.1 Identificación de la (+)-catequina	24
5.4.2.3.2 Identificación de la rutina	25
5.4.2.3.3 Identificación de la quercetina	26
5.4.2.3.4 Identificación del kaempferol	27
5.5 Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en el EMH	28
5.5.1 Cuantificación de (+)-catequina	28
5.5.2 Cuantificación de rutina	30
5.5.3 Cuantificación de quercetina	31
5.5.4 Cuantificación del kaempferol	31
5.6 Cuantificación de la rutina en el extracto metanólico no hidrolizado	31
6. DISCUSIÓN	32
6.1 Capacidad antioxidante	32
6.2 Determinación de fenoles totales y flavonoides	32
6.3 Identificación de algunos de los compuestos presentes en los extractos	33
7. CONCLUSIONES	36
8. REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía del árbol de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>) y sus frutos	3
2	Algunos ácidos benzoicos comunes en plantas	5
3	Fenilpropanoides frecuentemente buscados en plantas medicinales y alimenticias por sus efectos benéficos para la salud humana	6
4	Estructuras del resveratrol, de los flavonoides más comunes y de los senósidos	7
5	Cromatograma de la mezcla de estándares	21
6	Comparación de los cromatogramas de la rutina, del extracto metanólico y de la coelución	22
7	Espectros UV de la rutina pura y del pico correspondiente a este estándar en el extracto metanólico	22
8	Cromatograma de la mezcla de estándares y del extracto acuoso preparado mediante decocción del fruto	23
9	Cromatograma de la mezcla de estándares y del extracto acuoso obtenido por maceración del fruto	23
10	Cromatograma del EMH	24
11	Comparación de los cromatogramas de la (+)-catequina, del EMH y la coelución	24
12	Espectros UV de la (+)-catequina pura y el pico correspondiente a este estándar en el EMH	25
13	Comparación de los cromatogramas de la rutina, del EMH y de la coelución	25
14	Espectros UV de la rutina y el pico correspondiente a este estándar en el EMH	26
15	Comparación de los cromatogramas de la quercetina, del EMH y de la coelución	26

16	Espectros UV de la quercetina y el pico correspondiente a este estándar en el EMH	27
17	Comparación de los cromatogramas del kaempferol, del EMH y de la coelución	27
18	Espectros UV del kaempferol puro y del pico correspondiente a este estándar en el EMH	28
19	Curva de calibración para la (+)-catequina	28
20	Curva de calibración para la rutina	31
21	Curva de calibración para la quercetina	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Gradiente utilizado durante los análisis y la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de <i>Crataegus mexicana</i>	17
2	Rendimientos de extractos obtenidos de las hojas de <i>Crataegus mexicana</i>	19
3	Resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de <i>Crataegus mexicana</i>	19
4	Contenidos de fenoles totales y flavonoides en los extractos	20
5	Resumen de los flavonoides identificados y algunos de sus datos	34

1. ANTECEDENTES

1.1 Las plantas medicinales en la terapéutica

Las plantas medicinales se han usado desde tiempos inmemoriales para tratar o prevenir las enfermedades. La farmacia moderna se ha desarrollado gracias en gran medida a la investigación científica de las plantas medicinales. Aunque los medicamentos modernos han opacado durante un tiempo este uso, en las dos últimas décadas ha habido un resurgimiento a nivel mundial del interés de organismos mundiales como la OMS, dependencias gubernamentales responsables del sector salud, investigadores, industria farmacéutica y habitantes de las grandes aglomeraciones urbanas por los remedios tradicionales de origen vegetal. Diversos factores han propiciado ese interés por las plantas medicinales. Entre esos factores destacan el fracaso de la medicina moderna en proporcionar una terapéutica eficaz contra algunas de las enfermedades actuales, la idea generalizada de que lo natural es necesariamente más sano y más eficaz, las limitaciones económicas para la mayoría de la población mundial, la cultura tradicional profundamente arraigada del uso de plantas medicinales y la lejanía de los centros de salud. Muchos de los remedios tradicionales han demostrado su eficacia, mientras que otros su toxicidad, y otros más han sobrevivido gracias a su efecto de placebo. En cualquiera de los casos, es recomendable llevar a cabo estudios científicos que establezcan el potencial de esos remedios para promover la salud a través de la determinación de sus perfiles químicos y sus actividades farmacológicas.

Los efectos farmacológicos de las plantas medicinales y alimenticias dependen evidentemente de la naturaleza de sus principios activos, los cuales pueden ejercer su efecto a través de un componente determinado o a través del conjunto de compuestos presentes en los extractos tradicionalmente consumidos en esa forma. Entre los compuestos de mayor relevancia, a pesar de ser ubicuos en el reino vegetal, se encuentran los fenoles naturales. Son numerosos los estudios científicos que establecen una correlación directa entre el contenido fenólico de una planta y su actividad farmacológica, por ejemplo, la antioxidante y la antiinflamatoria, ejerciendo dicha actividad a través de varios

mecanismos de acción. En los pocos estudios químicos efectuados en especies del género *Crataegus*, se han caracterizado algunos compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. Sin embargo, ninguna de las 15 especies distribuidas en México ha sido objeto de estudio. Por ese motivo, el presente proyecto se planteó para investigar la presencia de algunos compuestos fenólicos comunes que pudieran estar presentes en los extractos acuosos y metanólicos de las hojas y de los frutos de un espécimen de *C. mexicana* DC. recolectado en Amealco, Querétaro. Como herramienta para lograr ese objetivo, se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de UV-visible de arreglo de diodos. La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención de los picos observados en los cromatogramas de los extractos y los espectros correspondientes a cada uno de ellos con los de los estándares. Los compuestos detectados se cuantificaron mediante curvas de calibración.

1.2 El género *Crataegus*

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 el sur. Diez de esas especies son endémicas. Se han encontrado en 20 de los 32 estados de la República Mexicana. Las regiones de mayor distribución son las que se ubican en la Sierra Madre Oriental, en la Occidental y 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* Eggl.). En Querétaro, se encuentra *Crataegus mexicana* DC. (anteriormente clasificada como *Crataegus pubescens*) 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).

1.3 Características botánicas y nombres comunes de *Crataegus mexicana*

C. mexicana (Figura 1) es un árbol de 4 a 7 metros de alto o a veces arbusto, de hoja decidua, por lo común provisto de espinas que a menudo son muy fuertes, hasta de 5 cm de largo, en ocasiones parcial o totalmente inerme. Los frutos son de un color amarillo-anaranjado, globoso o algo turbinado, de 1.5 a 2.5 cm de diámetro. Habita en bosques de encino o de pino-encino perturbados, a menudo en la vegetación secundaria correspondiente. Con frecuencia se ve protegido y cultivado a orillas de caminos, en cercas, así como en huertos familiares, generalmente a una altitud de 2000-2850 m. Se puede observar en flor de diciembre a mayo (agosto) y en fruto se ha colectado a lo largo del año, mayormente en noviembre y diciembre.



Figura 1. Fotografía del árbol de tejocote (*Crataegus mexicana*) y sus frutos.

Sus nombres comunes registrados en Querétaro son: karasa, karash, karasu (lengua purépecha), karhasi, manzanilla, manzanillo, tejocote. Fuera de Querétaro, se conoce como manzanita, manzanita tejocotera (Rzedowski y Calderon-de-Rzedowski, 2005).

1.4 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 (Kocyildiz 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 cardiaca (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 se han encontrado estudios farmacológicos efectuados con *Crataegus mexicana*.

1.5 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*, 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 mexicana*, no existen reportes de estudios químicos.

1.6 Compuestos fenólicos comunes en plantas

1.6.1 Fenoles simples y fenilpropanoides

Algunos compuestos fenólicos simples, exclusivamente biosintetizados por plantas y microorganismos, y cuya ingestión es requerida 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), protocatéuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), para-aminobenzoico (PABA), vanílico y salicílico (Figura 2). Todos ejercen efectos biológicos importantes. El ácido gálico es el componente estructural principal de los llamados taninos hidrolizables (pentagaloilglucosas) 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 produce anemia.

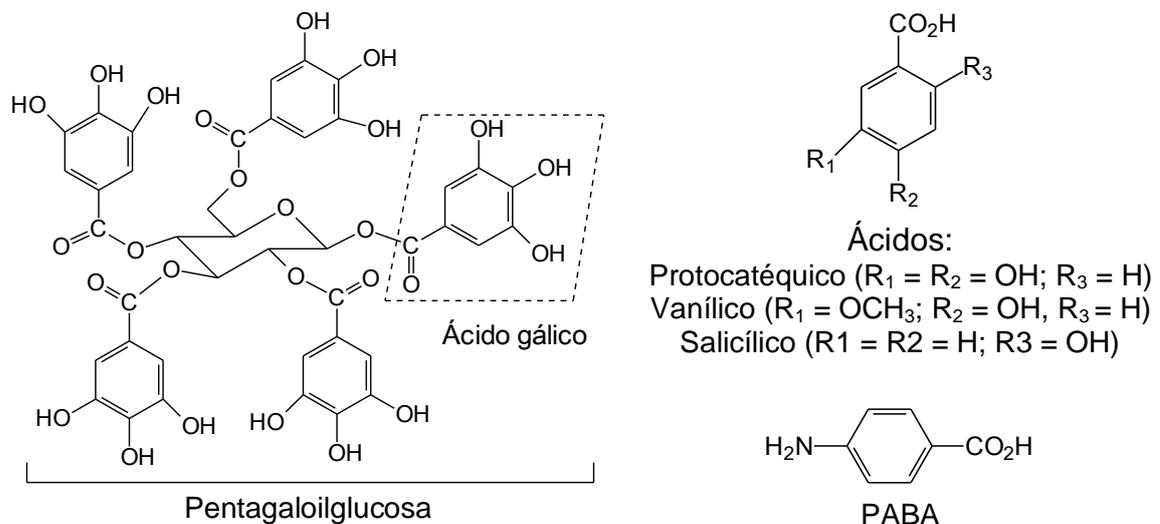


Figura 2. Algunos ácidos benzoicos comunes en plantas.

Los ácidos cinámicos (también conocidos como fenilpropanoides), como el para-cumárico, el caféico, el ferúlico y el sinápico (Figura 3), son otros metabolitos secundarios frecuentemente buscados en las plantas por sus variados efectos farmacológicos (ver secciones 1.7.1 y 1.7.2). El ácido clorogénico (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, entre ellas, 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).

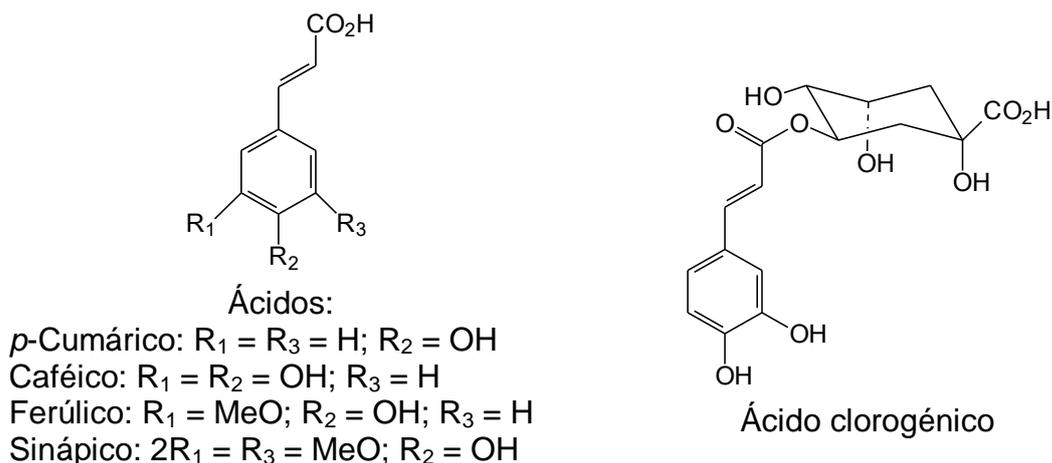


Figura 3. Fenilpropanoides frecuentemente buscados en plantas medicinales y alimenticias por sus efectos benéficos para la salud humana.

1.6.2 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 (ver sección 1.7.2). Se han identificado más de cuatro mil flavonoides. Entre los más comunes, se encuentran las catequinas, la quercetina, el caempferol (o canferol), la apigenina, la naringenina y la luteolina y sus correspondientes C- y O-glicósidos (Figura 4). 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 y las antocianinas, 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, 2007; Grace y col., 2009).

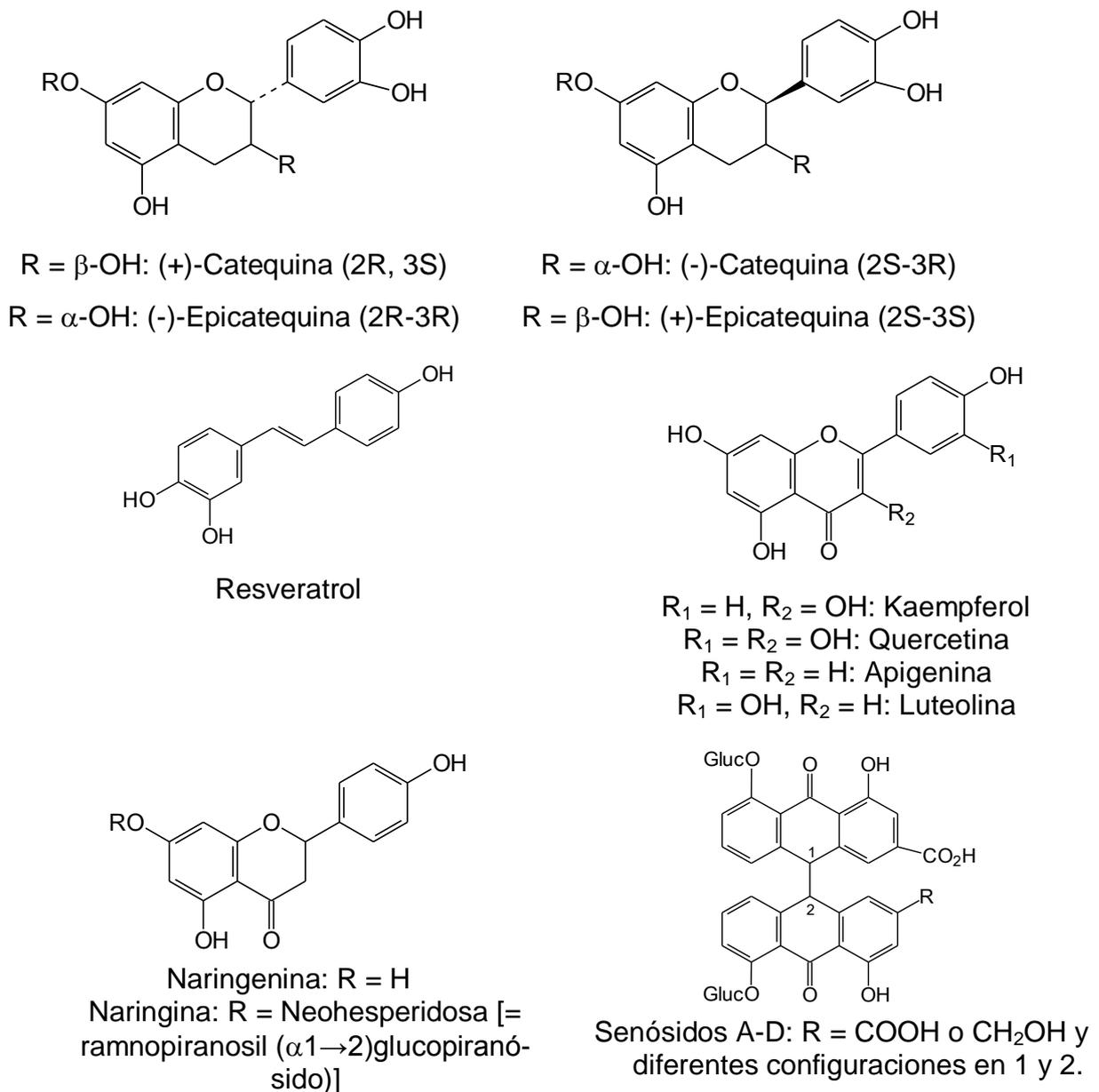


Figura 4. Estructuras del resveratrol, de los flavonoides más comunes y de los senósidos.

El resveratrol es el estilbeno responsable del llamado “milagro francés” que describe la escasa presencia de enfermedades degenerativas entre los franceses, por su consumo constante de vinos tintos ricos en ese metabolito (Pezzuto, 2006, 2008; Lee y col., 2008; Dudley y col., 2008; Qian y col., 2009a,b; Lin y col., 2010; Weng y col., 2010).

1.6.3 Policétidos aromáticos

Los policétidos aromáticos conocidos como senósidos (Figura 4) son los agentes purgantes presentes en los extractos de las plantas popularmente conocidas como sen (o senna), entre ellas *Cassia angustifolia* y *Cassia senna* del género *Cassia* (Dewick, 2002).

1.7 Importancia biológica de los compuestos fenólicos

1.7.1 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, 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 la actividad antioxidante, que 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).

Asimismo, se ha comprobado que la inflamación está directamente involucrada en la generación de enfermedades cardiovasculares, como en el caso de la ruptura de la placa aterosclerótica, la cual es la responsable directa del llamado síndrome coronario agudo (Jiang y Dusting-Gregory, 2003).

En cambio, con los estudios de campo sobre el poder curativo de extractos de plantas medicinales, no hay más datos que la recopilación de información etnomédica y etnobotánica, que sólo sirve como punto de partida para la preselección de fuentes potenciales de nuevos principios activos, sin que

se establezca previamente una relación directa entre actividad antiinflamatoria y cardiovascular.

1.7.2 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; Srivastava 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 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 metaloproteína endotelina (Jiang y Distingu-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). Los 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 Millard). 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 los flavonoides en particular revierten la disfunción endotelial vascular, reduciendo de esta forma el riesgo de ataques cardiacos (Duffy y Vita, 2003).

Es bien sabido que los flavonoides ejercen efectos benéficos sobre la salud al prevenir o revertir varias enfermedades degenerativas como el cáncer (Lopez-Lazaro, 2002; Mojziso va y Mojzis, 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). Algunos flavonoides en particular derivados de la luteolina, la rutina y el hiperósido ejercen 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).

2. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos y metanólicos de *Crataegus mexicana* son ricos en compuestos fenólicos y tienen una buena actividad antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos polares de las hojas y de los frutos de *Crataegus mexicana* recolectada en el municipio de Amelaco, Querétaro e identificar mediante cromatografía de líquidos de alta resolución algunos de los compuestos fenólicos más comunes que pudieran estar presentes en ellos.

3.2 Específicos

- Obtener el extracto metanólico de las hojas y dos extractos acuosos de los frutos.
- Obtener datos sobre su capacidad antioxidante mediante los métodos del DPPH y del FRAP.
- Conocer mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución la naturaleza de algunos de los compuestos fenólicos más comunes presentes en los extractos.
- Cuantificar los compuestos fenólicos identificados.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Material de estudio

Extracto metanólico de las hojas y extractos acuosos de los frutos

4.1.2 Equipos

4.1.2.1 Procesamiento del material vegetal

Estufa eléctrica para secado del material vegetal

Molino manual, marca VICTORIA

4.1.2.2 Procesamiento de los extractos

Tres rotaevaporadores

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)

Columnas analíticas y semipreparativas (XDB-C18, 4.6 x 250 mm con tamaño de poro de 5 μm , Agilent Technologies; $\mu\text{Porasil}$, 3.9 y 19.0 x 300 mm, 125 Å , 10 μm , Waters; Symmetry C-18, 120 Å ; 5 μm ; YMC ODS, S5 μm , 120 Å).

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 dispuso 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 degasificador 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

Se utilizaron sucesivamente hexano para desengrasar y posteriormente metanol para preparar el extracto de las hojas a partir del mismo material vegetal seco y molido. Como método de extracción, se recurrió a la maceración por una semana con cada disolvente. 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 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Este método consistió en mezclar $30\text{ }\mu\text{L}$ de extracto (diluido 1:10) con $150\text{ }\mu\text{L}$ de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 y $120\text{ }\mu\text{L}$ de Na_2CO_3 al 7.5%. La mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante 2 horas al término de las cuales se leyó la absorbancia a 765 nm . Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de $0\text{ }\mu\text{L}$ a $160\text{ }\mu\text{L}$ en intervalos de $20\text{ }\mu\text{L}$.

4.2.3 Determinación de flavonoides

Se realizó por el método propuesto por Zhishen y col. (1999). A $100\text{ }\mu\text{L}$ de muestra se agregaron $400\text{ }\mu\text{L}$ de agua destilada y $30\text{ }\mu\text{L}$ de NaNO_2 al 5%. Después de 5 minutos, se agregaron $30\text{ }\mu\text{L}$ de AlCl_3 al 10%; un minuto después, se agregaron $200\text{ }\mu\text{L}$ de NaOH 1 M. La mezcla se diluyó con $240\text{ }\mu\text{L}$ de agua destilada. Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar

de (+)-catequina (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 100 μ L en intervalos de 20 μ L. Se midió la absorbancia a 510 nm.

4.2.4 Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CAO) se evaluó sobre los extractos utilizando los ensayos del DPPH (2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil) y el FRAP (capacidad de reducción del ion férrico) (Corral-Aguayo y col., 2008).

4.2.4.1 Ensayo DPPH

Este método consistió en calcular la disminución en la absorbancia a 517 nm ocasionada por la reducción del radical libre DPPH; debido a su reacción con la muestra antioxidante, dando lugar a la formación de DPPH estable (Joon-Kwan y Takayuki, 2009).

En una microplaca de 96 pozos, se colocaron 20 μ l de cada extracto a evaluar y un blanco integrado por una mezcla de metanol, ácido fórmico y agua (80:2:18) por triplicado. Se adicionaron 280 μ L de solución de DPPH 100 μ M en metanol preparados inmediatamente antes de iniciar el ensayo. La mezcla se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (Dynex Technology, Chantilly, VA). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox en μ mol/100 gramos de peso fresco de muestra.

Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) en metanol (1 mg/mL) de la cual se tomaron los volúmenes correspondientes para obtener un intervalo de concentraciones de 0.02 mg/mL a 0.2 mg/mL.

4.2.4.2 Ensayo FRAP

Este ensayo se basa en la capacidad que tiene la muestra a evaluar para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . En este caso, la capacidad antioxidante se determinó por la formación del complejo Fe^{2+} -TPTZ [2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina] en

condiciones ácidas, el cual produce un intenso color azul con un máximo de absorción a 593 nm (Joon-Kwan y Takayuki, 2009).

El reactivo FRAP se preparó de la siguiente manera: 50 mL de solución amortiguadora de acetatos 300 mM (pH 3.6), 5 mL (10 mM) de 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) en HCl 40 mM y 5 mL de FeCl₃ 20 mM. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 20 µL de las muestras a evaluar y el blanco por triplicado; se adicionaron 280 µL de reactivo FRAP. La placa se incubó por 30 minutos en la oscuridad y se leyó la absorbancia de las muestras utilizando un filtro de 630 nm en un lector de microplacas (Dynex Technology, Chantilly, VA). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox en µmol/100 gramos de peso fresco.

Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) en metanol (1 mg/mL) de la cual se tomaron los volúmenes correspondientes para obtener un intervalo de concentraciones de 0.025 mg/mL a 0.8 mg/mL.

4.2.5 Análisis de fenoles individuales

Para el análisis cualitativo de los compuestos fenólicos, se pesó 1 mg de cada estándar y un 1 mg de cada extracto para preparar diluciones finales de alrededor de 0.1 µg/µL; 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 µm y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies). Dicha preparación se mantuvo en viales color ámbar para proteger de la luz componentes eventualmente 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.

4.2.6 Hidrólisis ácida de los extractos

En un matraz de 100 mL, se colocaron alrededor de 100 mg de extracto seco. Se agregaron unos 10 mL de agua grado cromatográfico (HPLC) o

metanol, de acuerdo a la solubilidad. Posteriormente, se agregaron 5 ml de HCl 2 N y se puso la mezcla 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 los estándares.

4.2.7 Hidrólisis básica de los extractos

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

4.2.8 Condiciones en HPLC

Se utilizó un método estandarizado para la caracterización de compuestos fenólicos en el que las condiciones dadas fueron: columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m, 150 x 4.6 mm d.i.) con pre-columna marca Agilent; fase móvil: gradiente la cual se explica a continuación; flujo: 0.8 mL/min; λ de detección: 280 nm; línea de inyección: 20 μ L; tiempo de corrida: 40 minutos. En el Cuadro 1 se muestra la composición del gradiente empleado durante esos análisis.

Con esas condiciones, se determinaron, por triplicado, los perfiles cualitativos y cuantitativos de las muestras.

Cuadro 1. Gradiente utilizado durante los análisis y la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de *Crataegus mexicana*.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	Ácido acético 0.0125 N	CH ₃ CN
0	95%	5%
2.0	95%	5%
5.0	85%	15%
20.0	50%	50%
25.0	95%	5%
35.0	95%	5%

4.2.9 Identificación de los compuestos fenólicos

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

4.2.10 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: 0.2, 0.2666, 0.4 y 0.8; quercetina: 0.0166, 0.0333, 0.0666 y 0.1333; rutina: 0.04, 0.0533, 0.08 y 0.16. Con las áreas bajo la curva que se obtuvieron, se estableció una curva de calibración, de la cual se pudo establecer una correlación lineal del tipo $y = ax + b$, la cual 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, obtenidos uno a partir de la decocción y otro a partir de la maceración del fruto, y uno metanólico, obtenido a partir de las hojas secas de *Crataegus mexicana*. Los porcentajes de rendimientos calculados se reportan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Rendimientos de extractos obtenidos de las hojas y de los frutos de *Crataegus mexicana*.

Extracto	Rendimiento (%)
Metanólico (hojas)	20.46
Acuoso (decocción del fruto)	1.61
Acuoso (maceración del fruto)	2.96

5.2 Actividad antioxidante de los extractos preparados

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos.

Cuadro 3. Resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Crataegus mexicana*

Muestra	DPPH (CT $\mu\text{M/g}$ de material vegetal) ¹	FRAP (CT $\mu\text{M/g}$ de material vegetal) ¹
Extracto acuoso por maceración del fruto	54.57 \pm 9.43	79.03 \pm 2.00
Extracto acuoso por decocción del fruto	105.89 \pm 26.74	217.84 \pm 13.26
Extracto metanólico por maceración de las hojas	1692.65 \pm 355.01	1211.31 \pm 26.83

¹ Concentración de Trolox en $\mu\text{M/g}$ de fruto fresco u hoja seca

5.3 Determinación de fenoles totales y flavonoides por el método de Folin-Ciocalteu

En el Cuadro 4 se muestra el contenido de fenoles totales y flavonoides de cada uno de los extractos analizados.

Cuadro 4. Contenidos de fenoles totales y flavonoides en los extractos.

Muestra	Fenoles totales (mg EAG ¹ /g de material vegetal ³)	Flavonoides (mg EC ² /g de material vegetal ³)
Extracto acuoso por maceración del fruto	15.73 ± 0.94	5.96 ± 0.73
Extracto acuoso por decocción del fruto	54.06 ± 5.03	14.37 ± 0.85
Extracto metanólico por maceración de las hojas	254.31 ± 5.87	76.07 ± 7.58

¹ EAG = mg equivalentes de ácido gálico

² EC = mg equivalentes de (+)-catequina.

³ Material vegetal = fruto fresco u hojas secas

5.4 Identificación de los compuestos fenólicos

5.4.1 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 todos (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 solo, extracto y extracto coeluido con el estándar). Este análisis permitió confirmar o descartar la presencia de los compuestos correspondientes. Como criterio adicional, y dentro del marco de los

desplazamientos batocrómicos e ipsocrómicos 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.

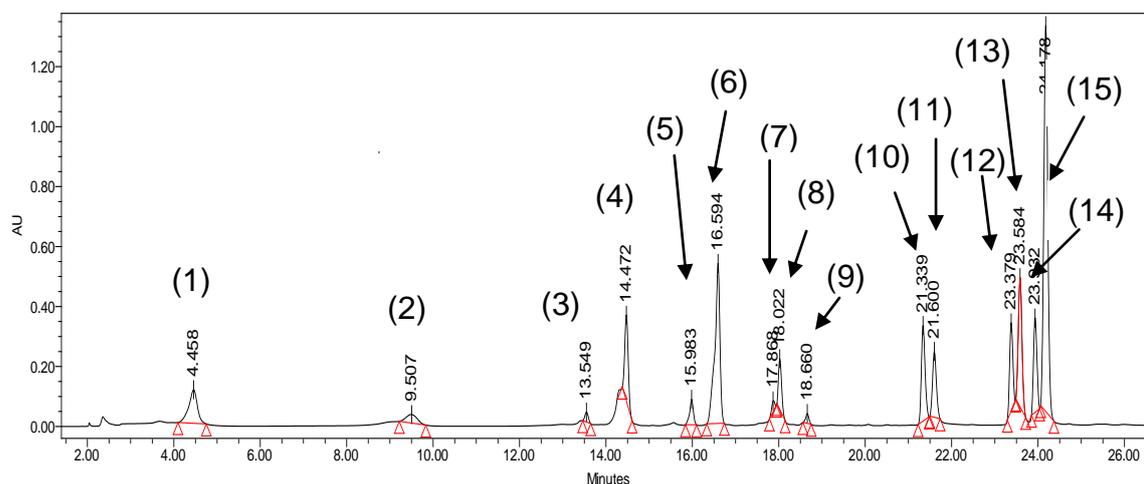


Figura 5. Cromatograma de la mezcla de estándares. (1) Ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) (+)-catequina, (4) ácido caféico, (5) rutina, (6) ácido *p*-cumárico, (7) hesperidina, (8) ácido rosmarínico, (9) miricetina, (10) luteolina, (11) quercetina, (12) apigenina, (13) naringenina, (14) kaempferol,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

5.4.2 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.

5.4.2.1 Identificación de la rutina en el extracto metanólico no hidrolizado

La comparación de los cromatogramas del estándar (negro), del extracto metanólico (azul) y de la coelución de ambos (verde) (Figura 6) permitió identificar claramente la presencia de la rutina, ya que se observó un incremento en la intensidad del pico con tiempo de retención de 15.95 min; dicha identidad se confirmó con los respectivos espectros UV (Figura 7).

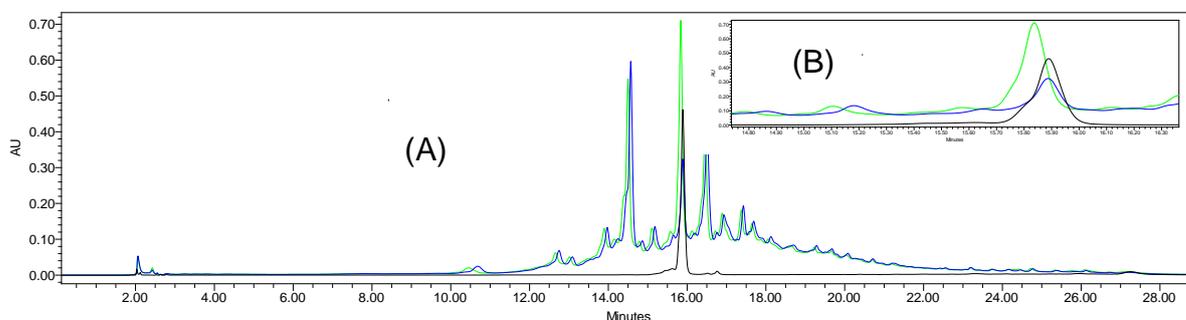


Figura 6. (A) Comparación de los cromatogramas de la rutina (negro), del extracto metanólico (azul) y de la coelución (verde); (B) ampliación de la zona de 14 a 16 minutos.

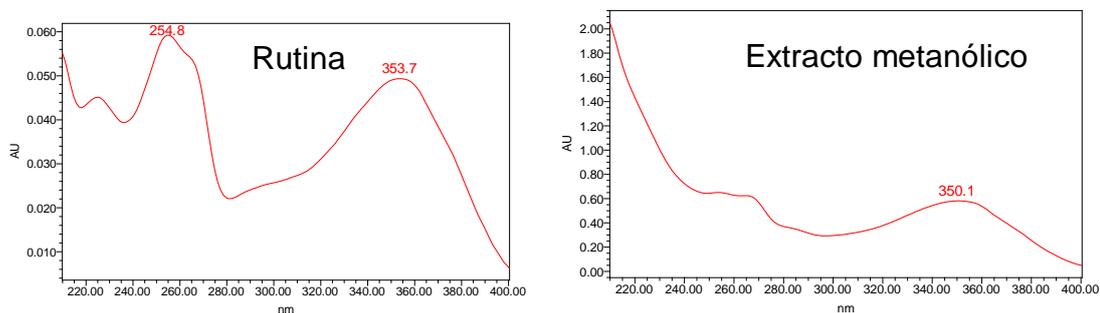


Figura 7. Espectros UV de la rutina pura (λ 254.8 nm y 353.7 nm) y el pico correspondiente a este estándar en el extracto metanólico (λ 350.1 nm).

5.4.2.2 Extractos acuosos no hidrolizados del fruto

La superposición de los cromatogramas de la mezcla de estándares y de los extractos acuosos obtenidos por decocción y por maceración reveló la ausencia de los estándares disponibles (Figuras 8 y 9).

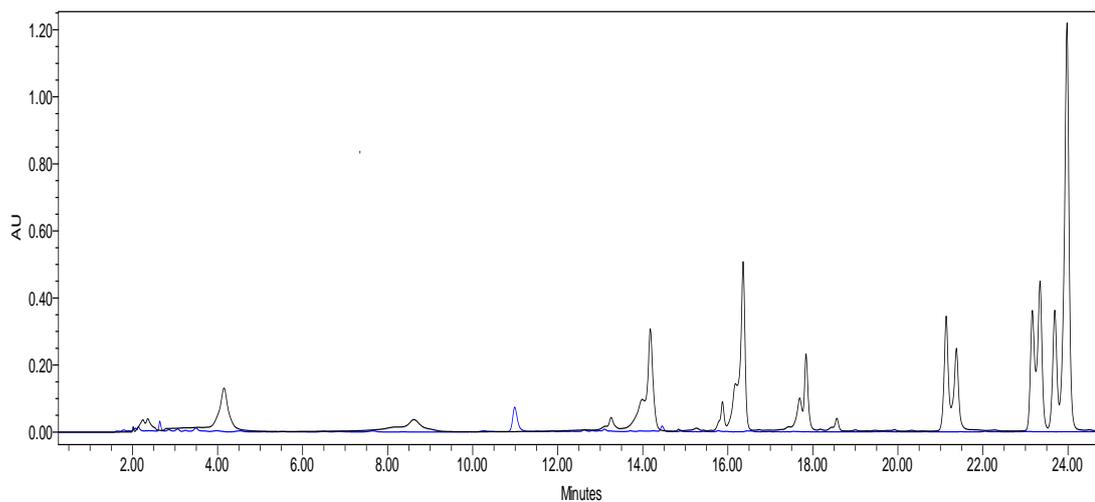


Figura 8. Cromatograma de la mezcla de estándares (negro) y del extracto acuoso preparado mediante decocción del fruto (azul).

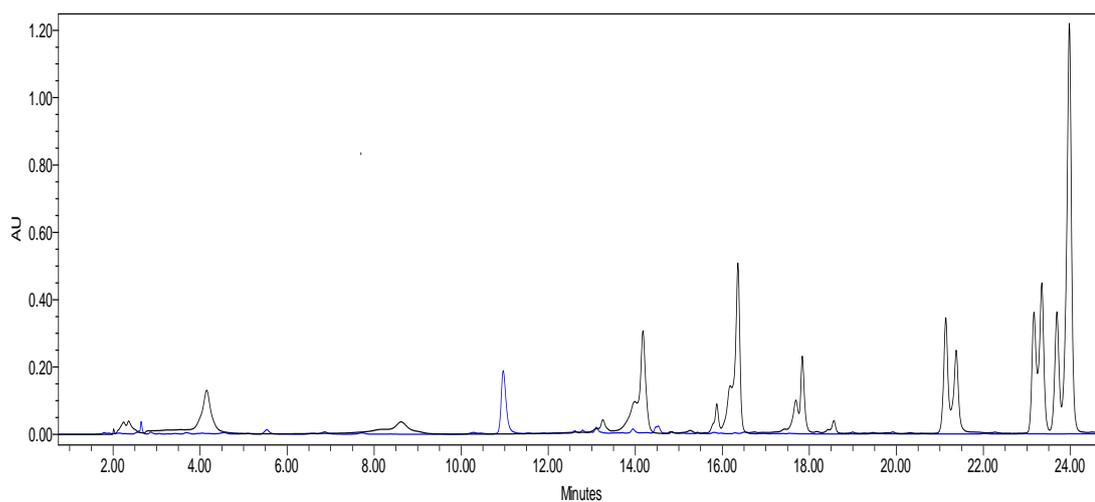


Figura 9. Cromatograma de la mezcla de estándares (negro) y del extracto acuoso obtenido por maceración del fruto (azul).

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

En el extracto metanólico hidrolizado en medio ácido (EMH), se detectaron la (+)-catequina (Tr 13.248 min), la rutina (Tr 15.880 min), la quercetina (Tr 21.323 min) y el kampferol (Tr 23.65 min) (Figura 10).

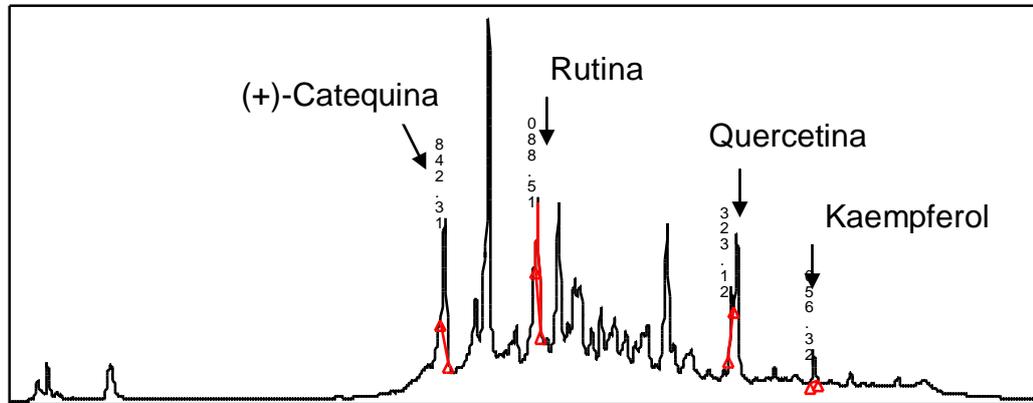


Figura 10. Cromatograma del EMH.

5.4.2.3.1 Identificación de la (+)-catequina

La comparación de los cromatogramas del estándar (azul), del extracto hidrolizado (negro) y de la coelución de ambos (verde) (Figura 11) permitió identificar claramente la presencia de la (+)-catequina, ya que se observó un incremento en la intensidad del pico con tiempo de retención de 13.248 min; dicha identidad se confirmó con los respectivos espectros UV (Figura 12).

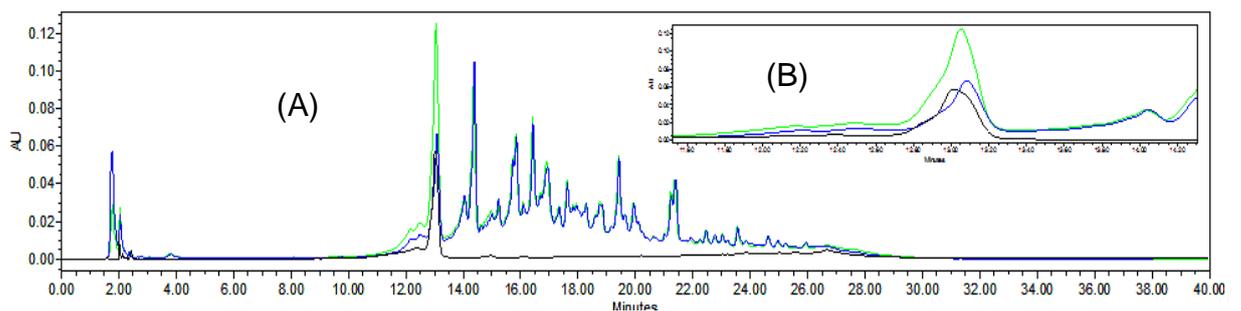


Figura 11. (A) Comparación de los cromatogramas de la (+)-catequina (negro), del EMH (azul) y de la coelución (verde); (B) ampliación de la zona de 12 a 14 minutos.

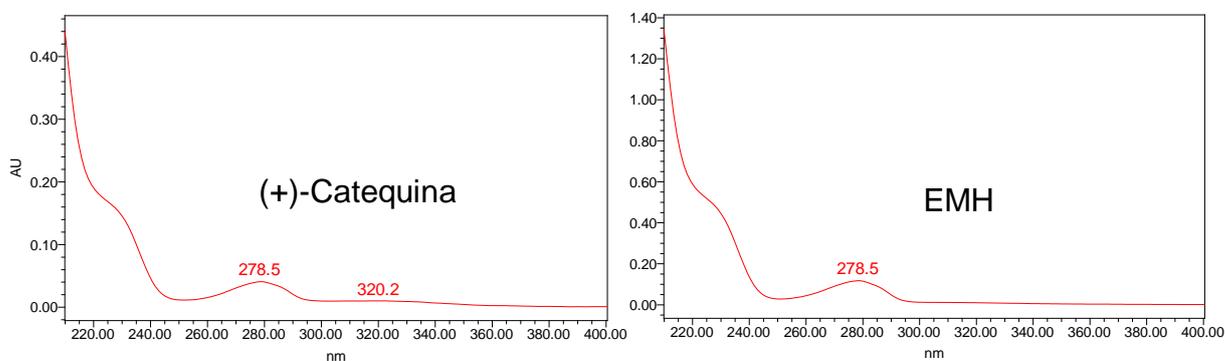


Figura 12. Espectros UV de la (+)-catequina pura (λ 278.5) y el pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ 278.5 nm).

5.4.2.3.2 Identificación de la rutina

La superposición del cromatograma de la mezcla de estándares y del EMH obtenido de *Crataegus mexicana* [Figura 13(A)] sugiere la posible presencia de la rutina con un tiempo de retención de 15.880 min. En la Figura 13(B), se muestra una ampliación de la coelución del extracto con el estándar y en la Figura 14, los respectivos espectros UV.

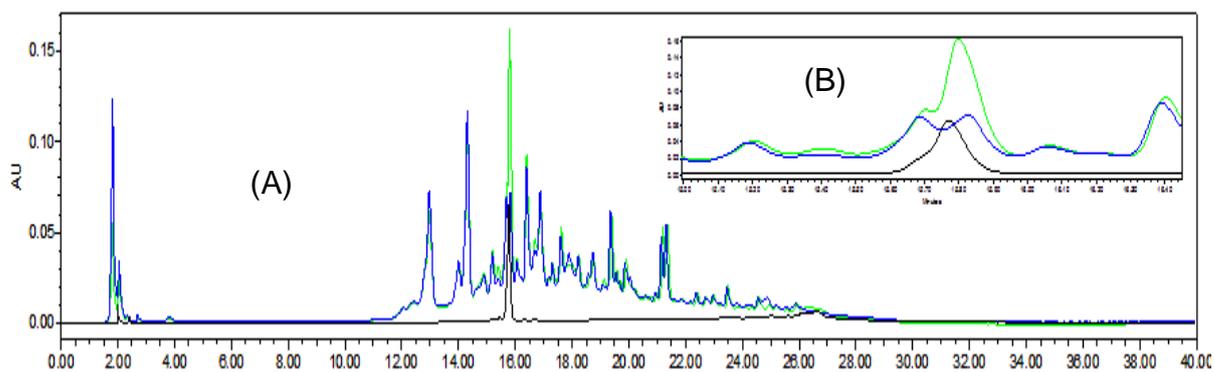


Figura 13. (A) Comparación de los cromatogramas de la rutina (negro), del EMH (azul) y de la coelución (verde); (B) ampliación de la zona de 15 a 16 minutos.

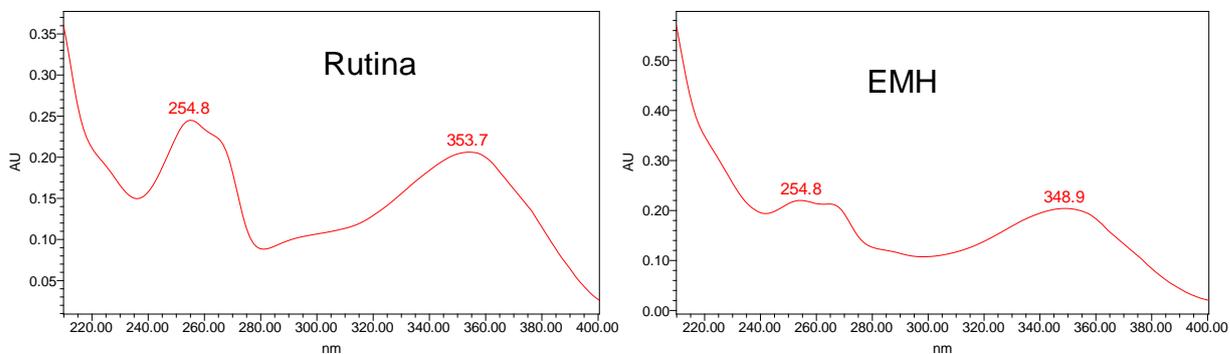


Figura 14. Espectros UV de la rutina (λ 254.8 y 353.7 nm) y el pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ 254.8 y 348.9 nm).

5.4.2.3.3 Identificación de la quercetina

La superposición del cromatograma de la mezcla de estándares y del EMH obtenido de *Crataegus mexicana* [Figura 15(A)] sugiere la posible presencia de la quercetina con un tiempo de retención de 21.323 min. En la Figura 15(B), se muestra una ampliación de la coelución del extracto con el estándar y en la Figura 16, los respectivos espectros UV.

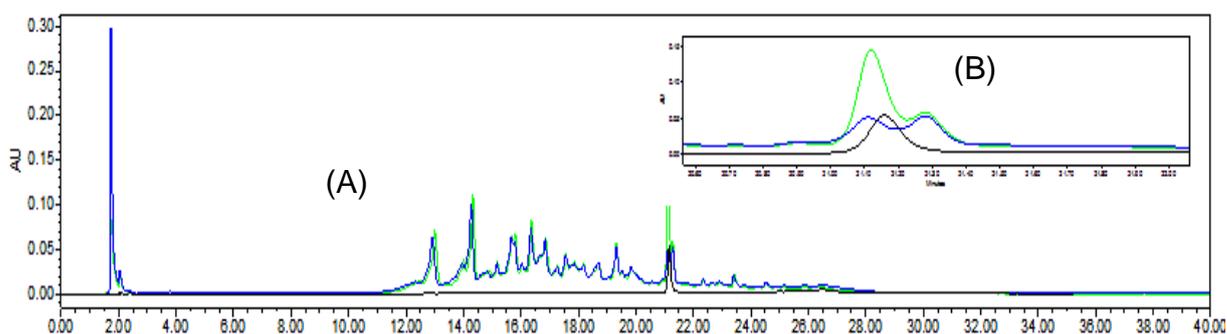


Figura 15. (A) Comparación de los cromatogramas de la quercetina (negro) y del EMH (azul) y la coelución (verde); (B) ampliación de la zona de 20 a 22 minutos.

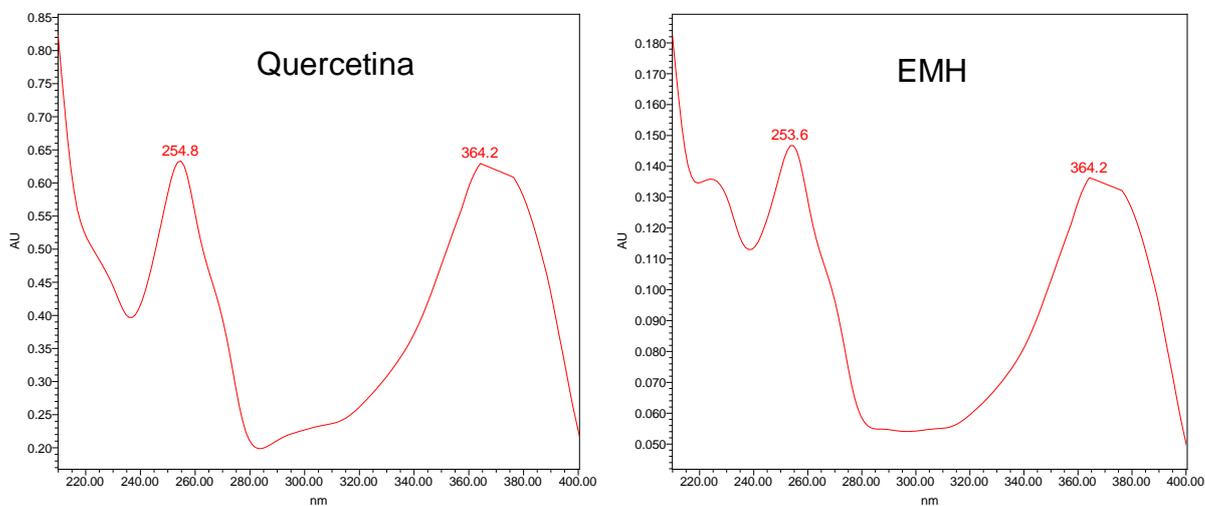


Figura 16. Espectros UV de la quercetina (λ 254.8 y 364.2 nm) y el pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ 253.6 y 364.2 nm).

5.4.2.3.4 Identificación del kaempferol

El incremento de la intensidad del pico con tiempo de retención de 23.65 min (Figura 17) que coincide con el del estándar sugirió la presencia de este flavonoide, lo cual se confirmó con la total coincidencia de los respectivos espectros UV (Figura 18).

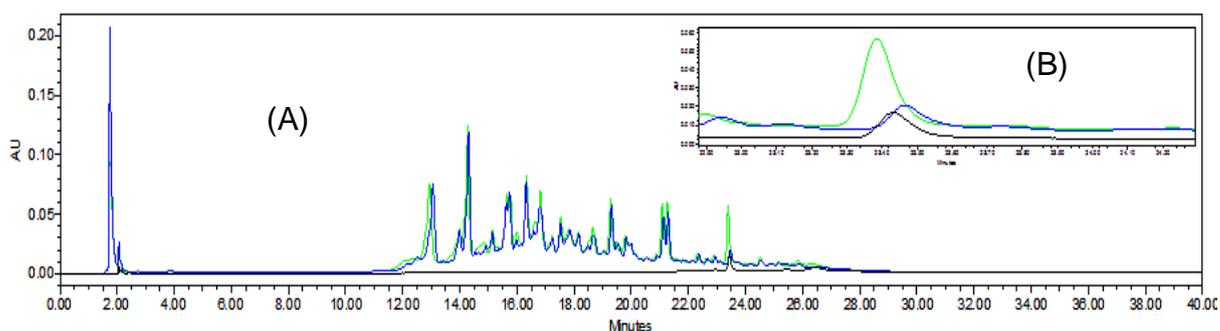


Figura 17. (A) Comparación de los cromatogramas del kaempferol (negro), del EMH (azul) y de la coelución (verde); (B) ampliación de la zona de 23 a 24 minutos.

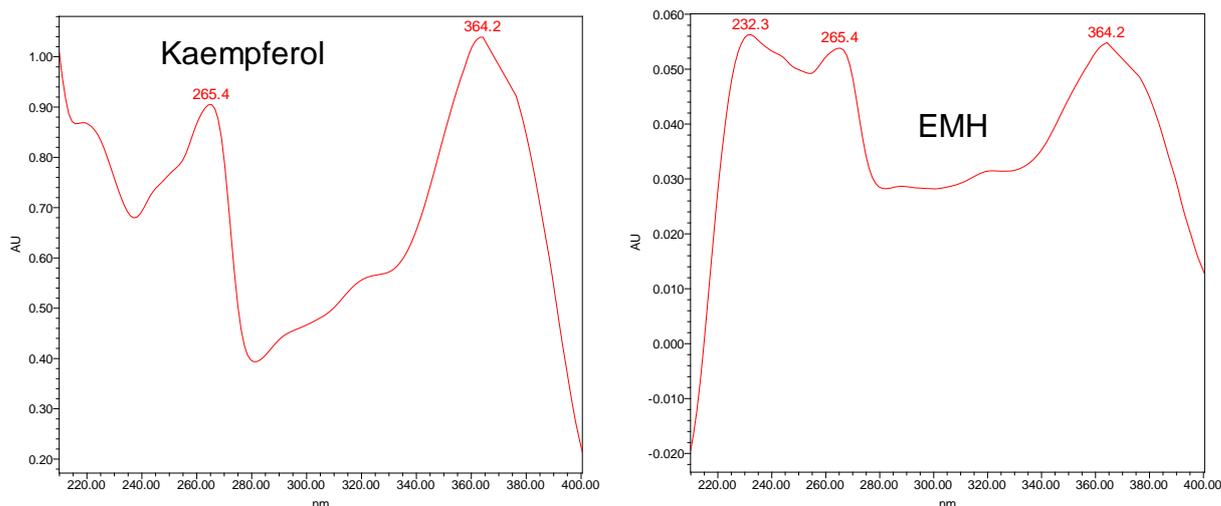


Figura 18. Espectros UV del kaempferol puro (λ 265.4 y 364.2 nm) y del pico correspondiente a este estándar en el EMH (λ 265.4 y 364.2 nm).

5.5 Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en el EMH

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.

5.5.1 Cuantificación de (+)-catequina

La Figura 19 muestra la curva de calibración obtenida para la cuantificación de la (+)-catequina.

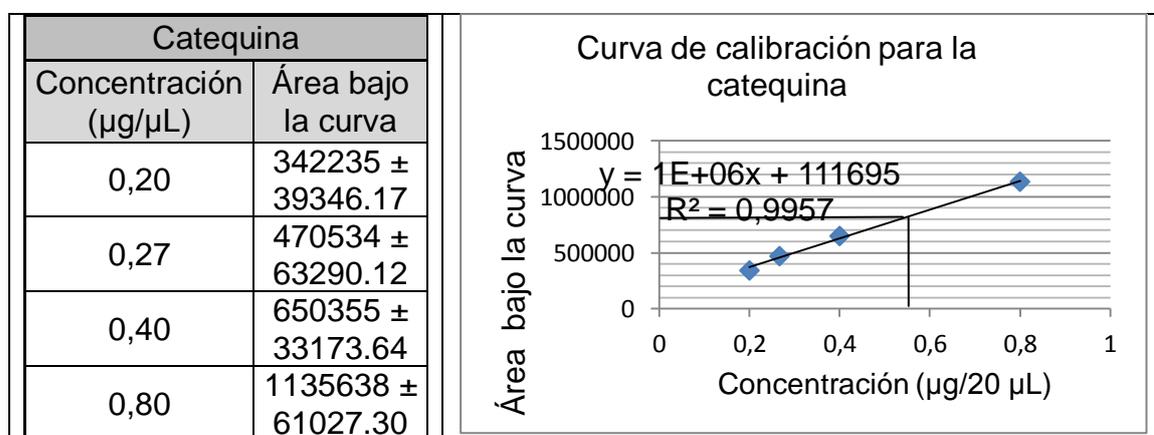


Figura 19. Curva de calibración para la (+)-catequina.

La sustitución del área experimental del pico (759460) identificado como (+)-catequina en la ecuación deducida permitió calcular la concentración (x) de este flavonoide en el EMH, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$x = (y - 111695)/10^6 = 0.6477 \mu\text{g}/20\mu\text{L}$$

Con este dato obtenido, se calculó la concentración que se tendría en 25 mL (25,000 μL) de la solución del EMH, los cuales se prepararon a partir de 106.3 mg de dicho extracto. El cálculo que se efectuó fue el siguiente:

$$25,000 \mu\text{L} (0.6477 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}) = 809.625 \mu\text{g}$$

Dado que esos 25 mL se prepararon a partir de 106.3 mg de extracto metanólico, se hizo la extrapolación a 1 g de extracto y el resultado fue:

$$1,000 \text{ mg} (809.625 \mu\text{g}/106.3 \text{ mg}) = 7,616 \mu\text{g}$$

Con este resultado obtenido se realizó el cálculo para saber qué cantidad de (+)-catequina se tiene en el extracto metanólico concentrado total, ya que el total del extracto que se obtuvo del material vegetal fue 150.2342 g. El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$150.2342 \text{ g} (7,616.415\mu\text{g} /1 \text{ g}) = 1,144,246 \mu\text{g}$$

Por último se hizo el cálculo para determinar la cantidad de (+)-catequina por gramo de material vegetal, ya que para el extracto metanólico se pesaron 734.1 g de materia vegetal (hojas secas) y el resultado fue el siguiente:

$$1 \text{ g} (1142246 \mu\text{g}/734.1 \text{ g}) = 1,558.7059 \mu\text{g}$$

De acuerdo con los cálculos realizados se puede decir concretamente que la concentración de (+)-catequina es de 1.5587mg/g de materia vegetal seco.

5.5.2 Cuantificación de rutina

Para determinar la concentración de rutina en el material vegetal de *Crataegus mexicana*, se obtuvo el área bajo la curva para este pico y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para cuantificar la concentración de (+)-catequina (Figura 20). De este modo, la concentración de rutina fue de 17.52 µg/g de hoja seca.

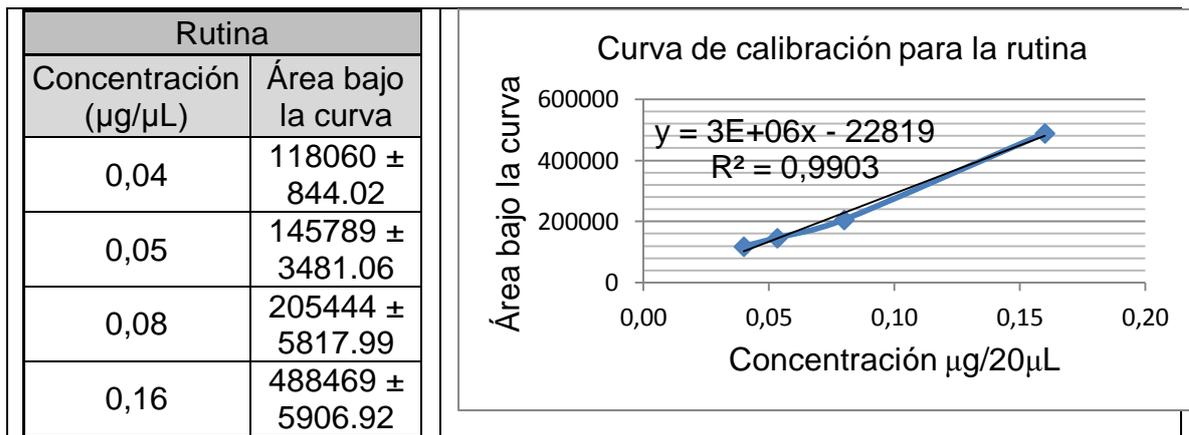


Figura 20. Curva de calibración para la rutina.

5.5.3 Cuantificación de quercetina

Siguiendo el mismo procedimiento, la cantidad de quercetina fue calculada haciendo la extrapolación del área obtenida para este pico en la curva de calibración correspondiente (Figura 21), resultando en 60.72 µg/g de hoja seca.

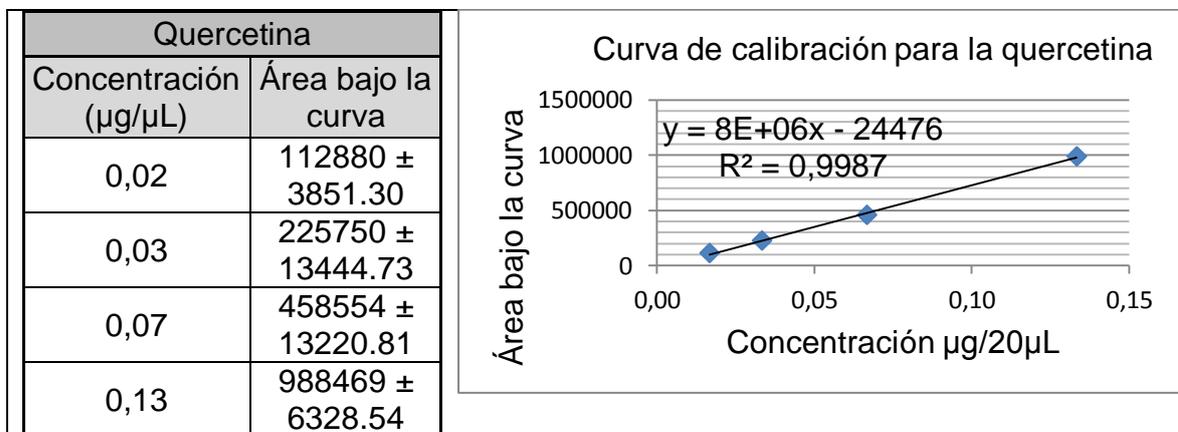


Figura 21. Curva de calibración para la quercetina.

5.5.4 Cuantificación del kaempferol

El kaempferol no pudo ser cuantificado debido a que se encontraba en muy pequeñas cantidades por lo que se puede decir que éste se encontraba solo en trazas.

5.6 Cuantificación de la rutina en el extracto metanólico no hidrolizado

Para determinar la concentración de rutina en el material vegetal de *Crataegus mexicana*, 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 de la rutina en el EMH. De este modo, la concentración de rutina en el extracto metanólico no hidrolizado fue de 820 µg/g de hoja seca.

6. DISCUSIÓN

6.1 Capacidad antioxidante

Como puede observarse en el Cuadro 3, independientemente del método utilizado (DPPH o FRAP), el extracto metanólico no hidrolizado exhibió una mayor capacidad antioxidante ($> 1000 \mu\text{M}$ de Trolox/g de muestra) que los dos extractos acuosos obtenidos del fruto (de 54 a $218 \mu\text{M}$ de Trolox/g de muestra). Comparando los resultados obtenidos en esta evaluación, los dos métodos muestran por su parte diferencias significativas entre ellos, ya que por el método DPPH, se obtuvo una menor capacidad para los extractos acuosos del fruto que en el del FRAP. Estas discrepancias pueden justificarse en base a los mecanismos mediante los cuales esos reactivos ejercen su actividad. Está bien establecido que en el caso del DPPH, su actividad antioxidante se ejerce a través de su capacidad de transferir radicales de hidrógeno, mientras que el FRAP mide la capacidad reductora de la muestra, o sea su capacidad de proporcionar electrones al agente oxidante. Esta observación comprueba claramente que para evitar una subestimación de la capacidad antioxidante de muestras, es necesario diversificar los métodos de evaluación. En el caso del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus mexicana*, resulta más conveniente utilizar el ensayo del DPPH.

6.2 Determinación de fenoles totales y flavonoides

El extracto metanólico original tuvo un contenido de fenoles totales (254.3 mg EAG/g de hoja seca) y flavonoides (76.1 mg EC/g de hoja seca) significativamente mayor que el de los extractos acuosos obtenidos por maceración y decocción. En este nivel, cabe pensar que la cantidad de agua en los frutos puede reducir la proporción de agentes antioxidantes por peso de muestra. Sin embargo, estos resultados concuerdan con las capacidades antioxidantes observadas y con los perfiles cromatográficos generados por los extractos durante sus análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. La comparación de los datos del Cuadro 4 muestra que los flavonoides representan el 30% de los compuestos fenólicos totales, aunque no se detectó ninguno de los fenilpropanoides utilizados como estándares, ni el

ácido gálico. Debido a la limitante de utilizar un mayor número de estándares, para caracterizar químicamente los demás compuestos, se tendría que proceder a la purificación de los constituyentes, seguida de su caracterización espectroscópica, o recurrir al método analítico que acopla HPLC con espectrometría de masas.

En un estudio realizado con extractos de plantas que se utilizan por sus propiedades medicinales y/o comestibles, se muestra el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides, así como la capacidad antioxidante medida por los ensayos DPPH y FRAP (Andarwulan y col., 2010). Al comparar los resultados descritos en dicho estudio con los que se obtuvieron en el presente trabajo, se observa que el contenido de fenoles totales de *Crataegus mexicana* es mayor al contenido de especies vegetales de amplio uso, como *Sauropus androgynus*, *Cosmos caudatus*, *Centella asiática*, entre otras. En cuanto al contenido de flavonoides, las hojas de *C. mexicana* presentaron un contenido mayor que los extractos de las especies mencionadas anteriormente (Andarwulan y col., 2010).

6.3 Identificación y cuantificación de algunos de los compuestos presentes en los extractos

Los extractos analizados 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 pudieran ser fenólicos. Sin embargo, en el extracto metanólico no hidrolizado, únicamente se identificó la rutina, mientras que ninguno de los picos derivados de los extractos de los frutos (por maceración o decocción) coincidió con alguno de los estándares. Por su parte, en el extracto metanólico hidrolizado en medio ácido, se logró identificar, además de la rutina, otros tres flavonoides: (+)-catequina, rutina y kaempferol. La detección del biósido rutina en el extracto hidrolizado, además de su aglicona (la quercetina) indica que las condiciones de hidrólisis no fueron suficientes para completar la reacción. Esta observación lleva a pensar que varios de los picos presentes en los cromatogramas pudieran consistir en poliósidos que no lograron hidrolizarse

para liberar sus respectivas agliconas polifenólicas. A pesar del riesgo de descomposición de algunos de los compuestos que eso implica, únicamente mediante la modificación de las condiciones de hidrólisis, como el empleo de una mayor concentración de ácido y más tiempo o temperatura de calentamiento, combinado con un mayor número de estándares, se podrá tener un mejor panorama del perfil de las agliconas presentes en los extractos. Estos resultados también indican que ninguna de las agliconas empleadas como estándar se encontraba presente en forma libre en los extractos no hidrolizados.

De los tres estándares encontrados en el EMH, el más abundante fue la (+)-catequina con una proporción de 1.5587 mg/g de material vegetal seco. Aunque todos estos estándares, con excepción de la rutina, solo fueron encontrados en el extracto hidrolizado, sus glicósidos son también importantes, ya que el organismo humano bien los puede hidrolizar con ayuda de enzimas y el medio ácido fisiológico y de esta forma aprovechar sus propiedades medicinales.

El Cuadro 5 resume los compuestos fenólicos identificados en el extracto metanólico de las hojas de *C. mexicana*.

Cuadro 5. Resumen de los flavonoides identificados y algunos de sus datos.

Compuesto	Tr promedio (min)	λ_{max} (nm)	Cantidad obtenida (/g de hoja seca)
(+)-catequina	13.25	278.5	1.5587 mg
Quercetina	21.30	253.6 y 264.2	60.72 μ g
Rutina	19.90	254.8 y 348.9	17.52 μ g
Kaempferol	23.65	265.4 y 364.2	No cuantificado

Los flavonoides encontrados tienen propiedades medicinales ya descritas en múltiples estudios donde han sido utilizados para tratar diferentes enfermedades como las úlceras, la inflamación, el cáncer, la artritis reumatoide,

enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, trombosis, entre otras (Bimlesh y col., 2011).

En un estudio realizado en el 2011, se describen ampliamente las propiedades biológicas del kaempferol, donde entre muchas, destacan sus actividades antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, bactericida, antiinflamatoria, el papel tan importante que tiene en enfermedades cardiovasculares, cerebrales y el rol que juega en la prevención de la aterosclerosis y la oxidación de las lipoproteínas (Calderón-Montaña y col., 2011). Ese estudio ha 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). Esto nos da la pauta para decir que aunque el Kaempferol encontrado no pudo ser cuantificado en *Crataegus mexicana* es de gran interés medicinal.

La quercetina, la cual se encontró en una concentración de 60.7207 µg/g de hoja seca, supera la concentración en algunas especies de plantas comestibles que se han estudiado para la búsqueda de flavonoides, entre ellas *Monochoria vaginalis*, *Solanum aethiopicum*, *Ipomoea aquatica*, *Anredera cordifolia*, *Telosma cordata*, *Telosma cordata*, *Lycopodiella cernua*, *Solanum esculentum* y *Wedelia trilobata* (Ray-Yu y col., 2008).

Otro estudio realizado en plantas tropicales comestibles también muestra el contenido de flavonoides encontrados en diferentes especies, donde al comparar con el resultado obtenido en el presente trabajo, se observa que la quercetina está en mayor proporción en *C. mexicana* que en especies como el brócoli, el ajo, las hojas del membrillo o belimbi, la zanahoria, el rábano blanco, la espinaca roja y el amaranto espinoso (*Amaranthus Spinousus*) (Miean y Mohamed, 2001.), lo cual sugiere que el consumo de esta planta traería mejores beneficios para la salud.

7. CONCLUSIONES

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

Los flavonoides que se detectaron en el extracto metanólico obtenido de la hidrólisis ácida del extracto metanólico de *Crataegus mexicana* fueron: (+)-catequina, quercetina, rutina y kampferol, de los cuales los primeros tres fueron cuantificables, siendo la (+)-catequina el flavonoide más abundante.

La especie *Crataegus mexicana* no solo contiene los cuatro flavonoides mencionados anteriormente, sino 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.

Los perfiles químicos de la decocción acuosa (“ponche”) y la maceración del fruto son muy pobres en metabolitos secundarios; no aportan una cantidad significativa de compuestos fenólicos, ni procura protección significativa contra radicales libres a través de otro tipo de metabolitos secundarios. Esto no descarta que los frutos tengan beneficios sobre la salud a través de su valor nutrimental.

Estos resultados justifican el por qué las hojas tienen mayor uso que los frutos 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.
- Andarwulan N.** Batari R. Sandrasari DA. Bolling B. Wijaya H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food chem.* **2010**;121:1231-1235.
- 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.
- Bimlesh K.** Sandhar HK. Prasher S. Tiwari P. Salhan M. Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Scien.* **2011**;1:26-27.
- 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 JM.** Burgos E. Pérez C. López 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.
- Corral-Aguayo R,** Yahia E, Carrillo-López A, González-Aguilar G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity

measured with six different assays in eight horticultural crops. J Agric Food Chem. **2008**;56:10498-10504.

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.

Dewick PM. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 2a edición. England: Editorial John Wiley & Sons, **2002**;61-62,129-130.

Dudley JI, Lekl I, Mukherjee S, Das M, Bertelli AAA, Das-Dipak K. Does White Wine Qualify for French Paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: Resveratrol, Tyrosol, and Hydroxytyrosol. J Agric Food Chem. **2008**;56:9362-9373.

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

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, Jordao 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.

Joon-Kwan M, Takayuki S. Antioxidant assay for plant and food components. J Agric Food Chem. **2009**;57:1655-1666.

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.

Lee SK, Zhang W, Sanderson BJS. Selective growth inhibition of human leukemia and human lymphoblastoid cells by resveratrol via cell cycle arrest and apoptosis induction. J Agric Food Chem. **2008**;56:7572-7577.

Lin JN, Lin VCH, Lin R, Shieh PC, Kuo DH, Shieh JC y col. Resveratrol modulates tumor cell proliferation and protein translation via SIRT1-dependent AMPK activation. J Agric Food Chem. **2010**;58:1584-1592.

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.

Miean K, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. Food Scien Biotech. **2001**;34:65-73.

Mojziso G, Mojzis J. Flavonoids and their potential health benefits: relation to heart diseases and cancer. Recent Progress in Medicinal 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 ecoclimática 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.
- Pezzuto** JM. Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *Oxidative Stress and Disease*, 20(Resveratrol in Health and Disease). **2006**;20:233-383.
- Pezzuto** JM. Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *Pharmac Biol.* **2008**;46:443-573.
- Phipps** JB, O'Kennon RJ, Lance RW. Hawthorns and medlars. Royal Horticultural Society. *Plant Collection Guide.* Timber Press, Portland, USA. **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''-Acetylvitexin-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.

Qian YP, Cai YJ, Fan GJ, Wei QY, Yang JZ, Zeng LF y col. Antioxidant-based lead discovery for cancer chemoprevention: the case of resveratrol. *J Med Chem*. **2009a**;52(7):1963-1974.

Qian YP, Cai YJ, Fan GJ, Wei QY, Yang JZ, Zeng LF y col. Antioxidant-based lead discovery for cancer chemoprevention: the case of resveratrol. *J Med Chem*. **2009b**;52(20):6504.

Ray-Yu Y, Shou-Lin B, George K. Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Asia Pac J Clin Nutr*. **2008**;17:275-279.

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.

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.

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

Schüssler M, Holzl 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 ChemTech 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.
- Srivastava** A, Greenspan P, Hartle DK, Hargrove JL, Amarowicz R, Pegg RB. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Polyphenolics from Southeastern U.S. Range Blackberry Cultivars. *J Agric Food Chem.* **2010**;58:6102-6109.
- Weng** CJ, WU CF, HUANG HW, WU CH, HO CT. Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells. *J Agri Food Chem.* **2010**;58:2886–2894.
- 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.
- Yonathan** M, Asres K, Assefa A, Bucar F. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. *J Ethnopharm.* **2006**;108:462-470.
- Zhishen** J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *J Agric Food Chem.* **1999**;64:555-559.