

Estudio de los flavonoides de diez genotipos de tejocote (*Crataegus pubescens*) y su uso potencial como alimento funcional.

M. C. Haydee Yazmín Hernández Unzón Director de Tesis

Alumna. Ena Margarita De la Cruz Martínez.

Introducción.

El tejocote pertenece a la familia de las Rosáceas, al género *Crataegus*, el cual agrupa alrededor de 150 especies en todo el mundo, de las cuales 95 de ellas se encuentran en el continente Americano, siendo 13 de ellas originarias de México (Phipps, 1997). La importancia del tejocote radica en su potencial uso como fruta fresca, portainjerto de otros frutales, forraje, fuente de pectina, ornamental y Medicinal (Nieto-Ángel y Borys, 1991), y su uso en la preparación de licores tradicionales y conservas. El nombre tejocote, es el más extendido en México, es de origen náhuatl, de las raíces “*tetl*” piedra y *xocotl* (agrio o ácido). Nieto Ángel y col., llevaron a cabo la colecta de las variedades dentro de la República Mexicana, de la cual obtuvieron el Banco de Germoplasma de tejocote de la Universidad Autónoma Chapingo,, encontrando una gran diversidad de genotipos.

Las hojas, flores y frutos han servido para preparar infusiones usadas en el tratamiento de la presión arterial alta o baja, de la taquicardia o de arritmias y aterosclerosis, (Nieto-Ángel y Borys, 1991, indican de acuerdo con los tipos y cantidades de productos químicos que contienen la fruta, hojas, flor, corteza de la raíz y del tallo, el tejocote posee un alto valor curativo de padecimientos como la tos, trastornos cardiacos leves y para el control de la obesidad y trastornos del corazón.

Hasman, 1996. Indica que los compuestos fenólicos tienen un modo de acción en el organismo humano, e indica que los frutos del género *Crataegus* sp, proporcionan uno de los mejores remedios tónicos para el corazón y el sistema circulatorio. Ya que actúan normalizando el trabajo del corazón, dependiendo de la necesidad, estimulando o disminuyendo esta actividad y que principalmente contienen (-)-epicatequina flavano-3-ol y de proantocianidinas relacionadas a la (-)-epicatequina. Urbonaviciute y col., 2006 estudiaron por análisis electroforético capilar los flavonoides en hojas y brotes de *Crataegus monogyna* Jack, tales como vitexina, quercetina, hiperosido, procianidinas oligoméricas las cuales parecen ser responsables de la acción cardíaca

Justificación.

Recientemente ha tomado importancia el estudio de los compuestos antioxidantes presentes en las plantas, especies del género *Crataegus*, han sido estudiadas sin embargo los estudios sobre los genotipos el tejocote es escasa. Tomando en cuenta que los extractos de *Crataegus* se han observado efectos benéficos en la salud y que en México existen varios genotipos los cuales son utilizados en la comida tradicional, su potencial como alimento funcional no ha sido estudiado.

Objetivo General.

Determinar las propiedades fisicoquímicas de 8 diferentes genotipos de tejocote obtenidos del Banco de Germoplasma de Chapingo.

Objetivos específicos.

Evaluar el contenido de fenoles y determinar la actividad antioxidante, de los genotipos de tejocote.

Materiales y Métodos.

Los tejocotes utilizados fueron proporcionados por el Dr. Raúl Nieto Angel, del Banco de Germoplasma de Tejocote, de la Universidad Autónoma Chapingo (BGTUACH). En el Cuadro 1, se muestran las claves, el origen, el grupo, género y especie de las muestras de tejocote, la muestra denominada extra, es del estado de Hidalgo. Todos los frutos estudiados fueron en la etapa de madurez comercial. Como se observa en la Figura 1.

Cuadro 1.-Claves, origen, grupo, género y especie de las muestras de tejocote.

Clave	Estado de Origen	Grupo	Género	Especie
ACC18	Chiapas	2	<i>Crataegus</i>	<i>nelsoni</i>
ACC19	Chiapas	2	<i>Crataegus</i>	<i>nelsoni</i>
ACC22	Chiapas	2	<i>Crataegus</i>	<i>nelsoni</i>
ACC25	Puebla	4	<i>Crataegus</i>	
ACC63	México	5	<i>Crataegus</i>	<i>gracilior</i>
ACC72	Chiapas	4	<i>Crataegus</i>	
ACC100	Puebla	1	<i>Crataegus</i>	<i>mexicana</i>
Extra	Hidalgo		<i>Crataegus</i>	<i>pubescens</i>



Figura 1.- Fotografías de las muestras de tejocote (*Crataegus* sp).

Se determinó el peso de 30 frutos expresado en gramos en una balanza electrónica, su diámetro ecuatorial y polar con ayuda de un vernier, el volumen por desplazamiento hectolítrico, la densidad por la relación peso/volumen de las muestras. El color se determinó con ayuda del Atlas de colores de Küppers.

La acidez titulable de las muestras se determinó por triplicado, utilizando extractos acuosos conteniendo 10g de pulpa de tejocote en 100 ml de agua destilada, la titulación se llevo a cabo con NaOH 0.01M, y se expresa en como ácido málico (g/100g en base fresca), el contenido de azúcares directos (glucosa y fructosa) y sacarosa, se llevaron a cabo utilizando muestras extraídas en alcohol, con base al método colorimétrico de Ting, 1956. Los fenoles totales fueron cuantificados utilizando el reactivo de Folin-Cicalteau, evaluando espectrofotométricamente a 760 nm y expresados como ácido tánico.

Se determinaron los compuestos fenólicos por cromatografía en capa fina, utilizando placas de sílica gel de 20x20 Merck, Las placas con las muestras de los extractos alcohólicos concentrados de los tejocotes se corrieron con butanol:acético :agua (4:1:5) capa superior, las fracciones se revelaron con luz visible, luz ultravioleta y con vapores de amoniaco. Se determinaron los Rf (relación entre el frente de soluto contra frente de disolvente), y fueron comparados con la bibliografía (Lederer, Ranganna y Metsz.).

Las fracciones principales fracciones fueron eluidas, se llevó a cabo el espectro de absorción (600 a 260 nm) en un espectrofotómetro Perkin Elmer y en un equipo de espectroscopía infrarrojo Bruker Tensor 27 (Instituto de Química de la UNAM).

La actividad antioxidante fue evaluada en los extractos concentrados utilizando el método de blanqueamiento de β -caroteno de Velioglu y Mazza, 1998), se calculó como valor antioxidante (AOX), porcentaje de inhibición relativa (AA), velocidad de oxidación (ORR) y el cociente de actividad antioxidante (AAC).

Resultados.

Las determinaciones físicas del peso promedio, diámetro ecuatorial y polar, volumen, esfericidad y densidad de los genotipos de tejocote estudiados, se muestran en el Cuadro 2. Los genotipos ACC25 y ACC72, son los de menor peso, los genotipos ACC19 y ACC22 pesan el doble de los primeros mientras que el extra es 20 veces más pesado. Tomando en cuenta los diámetros ecuatoriales y polares, se calculo la esfericidad de los frutos estudiados, se encontró que el genotipo ACC18 es más achatado, mientras que los ACC19, ACC22 y extra corresponden a la clasificación de ligeramente achatados (0.95), y aproximadamente esféricos los genotipos ACC25, ACC72 y ACC100. Se encontró una alta correlación (0.995), entre el peso y el volumen de los tejocotes. ($Y_{\text{volumen}} = 1.304 X_{\text{peso}} - 0.530$).

Con respecto a la densidad se pueden agrupar en tres grupos, los de densidad aproximadamente de 1, 0.8 y 0.6, (A) (B) y (C), respectivamente como se puede observar en el Cuadro 2. En el Cuadro 3 se muestran los colores que presentaron los frutos, utilizando el atlas de colores de Küppers.

Cuadro 2. Peso, diámetro ecuatorial y polar, volumen, esfericidad y densidad de los tejocotes.

Clave	Peso (g)	Diámetro (cm)		Volumen (cm ³)	Esfericidad (φ polar/ φ ecuatorial)	Densidad (g/cm ³)	
		Ecuatorial	Polar				
ACC18	3.72 ±0.74	2.05±0.17	1.58±0.12	4.54±0.41	0.77±0.05	0.819±0.090	B
ACC19	2.06 ±0.45	1.53±0.11	1.35±0.13	2.06±0.19	0.88±0.05	0.999±0.137	A
ACC22	3.14 ±0.63	1.80±0.15	1.54±0.10	3.17±0.29	0.85±0.04	0.990±0.105	A
ACC25	1.35 ±0.30	1.33±0.13	1.30±0.08	1.33±0.23	0.98±0.07	1.015±0.043	A
ACC63	6.74 ±0.96	2.48 ±0.18	2.35±0.07	6.74±1.61	0.95±0.06	1.016±0.103	A
ACC72	1.33 ±0.18	1.40 ±0.10	1.40±0.07	2.05±0.31	1.01±0.06	0.644±0.002	C
ACC100	10.86 ±2.10	2.80± 0.23	2.72±0.17	14.60±0.78	0.97±0.06	0.749±0.110	B
Extra	27.51 ±3.70	4.07 ±0.25	3.48±0.26	35.67±3.97	0.86±0.07	0.776±0.017	B

Cuadro 3.- colores de los genotipos de tejocotes utilizando la escala de Küppers.

CLAVE DE BGTUACH	CLAVE DE COLOR			COLOR
	N	Y	M	
ACC18	60	60	99	
ACC19	40	70	90	
ACC22	20	70	20	
ACC25	20	70	90	
	10	90	40	
ACC63	20	90	60	
	10	99	40	
ACC72	40	70	90	
ACC100	10	90	30	
Extra	10	99	30	

El contenido de azúcares de los genotipos de tejocote se muestran en el Cuadro 4, en donde se puede observar que el contenido de glucosa es bajo excepto en el genotipo ACC100, la fructosa se encuentra presente entre 0.2 y 0.8 g/100 g de muestra. El azúcar que se encuentra en mayor proporción en todos los casos es la sacarosa entre el 38 y 89 % , en promedio 71 %.

Cuadro 4. Contenido de fructosa, glucosa y sacarosa de los frutos de tejocote.

Clave	Azúcares (g/100 g mf)			
	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Azúcares totales
ACC18	0.23±0.01	0.13±0.007	2.72±0.01	3.08
ACC19	0.28±0.01	0.08±0.004	0.66±0.01	1.74
ACC22	0.70±0.04	0.0±	2.19±0.20	2.89
ACC25	0.29±0.01	0.02±0.001	2.58±0.07	2.89
ACC63	0.61±0.03	0.04±0.002	2.43±0.04	3.08
ACC72	0.33±0.02	0.01±0.0003	2.17±0.01	2.51
ACC100	0.33±0.02	0.52±0.026	0.64±0.02	1.49
Extra	0.78±0.04	0.01±0.0001	1.72±0.02	2.51

La acidez titulable, °Bx. relación azúcares acidez (AZ/AT), fenoles totales y extracto no nitrogenado se muestran en el Cuadro 5. Con respecto al contenido de acidez titulable, expresada como ácido málico se encontró entre 0.05 y 0.17 g/100 g de muestra fresca para los genotipos ACC22 y ACC18 respectivamente. Teniendo en cuenta que estos valores de acidez titulable corresponden a frutos analizados en poscosecha, estos coinciden con los datos reportados por Martínez y col., 1999, para dos selecciones de tejocote del Edo. de México, el contenido de sólidos solubles fue de 2.2 a 4.5 para ACC63 y ACC72 respectivamente. Debido al bajo contenido de acidez y contenido de azúcares de 2.2, la relación azúcares/acidez obtenida mostro valores entre 17 y 58, para los genotipos ACC100 y ACC22. Como se muestra en los Cuadros 4 y 5, aunque los contenidos de azúcares sean de 1.49 y 2.89, debido a que el contenido de acidez es bajo, los frutos presentarían un sabor dulce.

Con respecto al contenido de fenoles se encontró gran variabilidad, desde muy bajo contenido como el genotipo ACC25 (7.3 mg/100 g) a 509 mg/100 g para el genotipo ACC72, aproximadamente 70 veces más que ACC25. Los contenidos de compuestos fenólicos para los genotipos ACC18, ACC63 son los únicos que se encuentran dentro del intervalo, reportados por Martínez y col., 1999 para las selecciones San Pablo y Tetela de 331 y 301 mg/100g.

Los contenidos de humedad, para las pulpas de tejocote se encontraron entre 72.35 y 76.74 g/100 g de muestra, que en promedio corresponden a los valores reportados en la tabla de valor nutritivo de los alimentos de 74.70 g/100 g. Los contenidos del extracto no nitrogenado que corresponde principalmente a los polisacáridos tales como las pectinas, celulosa y hemicelulosas se obtuvieron por diferencia. En promedio se obtuvo un valor de 22.99 ± 2.06 , mientras que se reportan 22.00 de hidratos de carbono y 2.7 de fibra, semejantes a los obtenidos para los genotipos estudiados. Se determinó el contenido de carotenoides totales, se encontró el genotipo ACC 72 presento 50 mg/g de carotenoides mientras que los genotipos extra, ACC100 y Acc18 los más bajos.

Cuadro 5 .- Contenido de acidez titulable, °Bx, relación azúcares/acidez, fenoles totales, humedad y extracto no nitrogenado (ENN) y carotenoides (K) en los genotipos de tejocote.

Clave	Acidez titulable (g/100g)mf	°Bx	Relación AZ/AT	Fenoles totales (mg/100g mf)	Humedad (g/100 g)	ENN (g/100 g)	K (mg/g)
ACC18	0.17 ± 0.01	4.0	18	307.45 ± 0.09	72.72 ± 1.74	23.72	8.47
ACC19	0.07 ± 0.01	3.9	25	15.69 ± 0.01	73.06 ± 2.48	25.11	nd
ACC22	0.05 ± 0.005	4.0	58	23.53 ± 0.01	74.14 ± 2.68	22.90	44.51
ACC25	0.07 ± 0.001	4.2	41	7.32 ± 0.12	72.35 ± 2.30	24.68	18.43
ACC63	0.07 ± 0.01	2.2	44	375.69 ± 0.03	76.74 ± 2.96	19.73	35.56
ACC72	0.07 ± 0.005	4.5	36	509.02 ± 0.13	72.32 ± 2.20	24.59	50.00
ACC100	0.09 ± 0.004	3.8	17	99.61 ± 0.02	75.99 ± 3.18	22.33	8.84
Extra	0.07 ± 0.01	4.3	36	55.42 ± 0.01	76.51 ± 2.70	20.85	7.42

Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos, utilizando el método espectrofotométrico de Marco, que se basa en la capacidad antioxidante que tiene la muestra a evaluar, para evitar la oxidación del b-caroteno, a partir de una muestra equivalente a 0.2 g de tejocote, los resultados obtenidos mostrados en el Cuadro 6 indican que los genotipo ACC22 y ACC18 presenta mayor actividad antioxidante, mientras que el genotipo extra presento el menor valor de actividad antioxidante, siendo este último el de mayor tamaño, sin embargo no existe una correlación muy baja (0.07), entre la actividad antioxidante y el peso del fruto. Se trató de encontrar alguna correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles, sin embargo no se encontró ninguna correlación.

Cuadro 6.- Actividad antioxidante de los extractos de tejocote.

Clave	AOX	AA	ORR	AAC
ACC18	-0.0155	59.16	0.408	122.020
ACC19	-0.0070	42.70	0.573	24.986
ACC22	-0.0108	62.24	0.378	96.151
ACC25	-0.0103	25.42	0.746	19.064
ACC63	-0.0132	45.58	0.544	58.286
ACC72	-0.0050	26.81	0.732	7.322
ACC100	-0.0110	49.89	0.501	56.952
Extra	-0.0040	15.79	0.842	1.890
BHT	0	99.36	0.007	97.98
CONTROL	-0.0049	0	1.000	0

Se llevo a cabo las cromatografías en capa fina de los extractos alcohólicos concentrados de las pulpas de tejocote. En el Cuadro 7a se muestran los Rf obtenidos de cada uno de los extractos, los cuales fueron agrupados según su valor de Rf. , De los cuales se puede observar que las muestras ACC22 y ACC72, muestran mayor número de bandas observadas en luz visible, luz ultravioleta y con amoniaco, la muestra ACC19, aparentemente no presento ninguna mancha visible con estos tres reveladores. En el Cuadro 8 se muestran las posibles identificaciones a partir de los Rf promedio de cada una de las bandas obtenidas. Se puede observar que la mayoría de las bandas encontradas coinciden con algunas de las reportadas en otros genotipos reportados, tales como las procianidinas (Procianidina C1, B2, B4 y B5) que por su peso molecular su Rf son bajos (0.013 a0.022), (-) epicatequina, Catequina. Ácido clorogénico Ácido 5-O cafeoilquinico Ácido 5-O-transvoumaroilquinico Ácido 5-O-cis coumaroilquínico Catekquin-4^a-8 epicatequin Hipperosido, rutina, vitexina-2^{''}-O-ramnosido e hiperosido, como se puede observar en el Cuadro 7b.

Estos resultados están siendo comprobados tanto por espectrometría infrarrojo (Instituto de Química de la UNAM) (ya se tienen falta por analizar) y por HPLC en la Central de espectroscopia de la ENCB).

Cuadro 7a.- Rf de los genotipos de tejocote obtenidos por CCF utilizando butanol acético agua (4:1:5)

Rf	Clave de genotipo de tejocote							promedio
	ACC18	ACC22	ACC25	ACC63	ACC72	ACC100	Extra	
1	0.013	0.013	0.006		0.025	0.006		0.0126
2	0.059				0.042	0.056	0.051	0.052
3		0.082	0.074		0.074			0.077
4		0.120	0.114		0.128			0.121
5		0.154		0.148				0.151
6		0.198			0.188			0.193
7		0.219	0.216		0.240			0.225
8		0.311	0.285	0.292			0.309	0.299
9	0.364	0.362	0.353					0.360
10			0.386	0.372		0.375	0.371	0.376
11	0.400	0.405						0.403
12						0.434		0.434
13					0.530			0.530
14		0.603			0.580			0.592
15			0.632		0.620			0.626
16		0.681			0.670			0.676
17		0.732	0.761	0.746	0.770		0.759	0.754
18		0.844						0.844
19		0.896			0.880			0.888
20		0.931						0.931
21		0.974			0.960			0.967

Cuadro 7b. Comparación entre los Rf de las fracciones obtenidas por CCF con los datos reportados en la bibliografía.

Rf	Clave de genotipo de tejocote			
	promedio			lederer Seikel
1	0.013		Procianidina	
2	0.052			
3	0.077			
4	0.121		Procianidina B2	
5	0.151		Procianidinas b4 y b5	
6	0.193			
7	0.225		Quercetagetina	0.22
8	0.299			
9	0.360			
10	0.376		Acido p-coumarico	0.37
11	0.403		Hesperidina	0.40
12	0.434		Vitexina	
13	0.530		Epicatequina	0.52
14	0.592		Rutina	0.57
15	0.626		Flavonol	0.65
16	0.676		Epicatequina	0.65
17	0.754		Isoquecetina	0.72
18	0.844		Kaempferol	0.85
19	0.888		Flavanona aglicona	0.88
20	0.931		Chrysin	0.93
21	0.967		Flavanona	0.97

Bibliografía.

Borys, M.W. 1989. Valor ecológico de tejocote (*Crataegus* spp). Congreso “La Era Ecológica”. Resumen Puebla, Pue. México 11-24 pp.

Nieto-Angel, R., Borys, M.W. 1991. El tejocote (*Crataegus* spp.) en México: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos en México. Soc. Mex. De Fitogenética, Chapingo 309-324 pp.

Phipps, J.B. 1997. Monograph of northern mexican *Crataegus* (Rosaceae, sufam. Maloidae). SIDA Botanical Miscellany 15. Botanical Research Institute of Texas. Inc. / (BRIT), Texas, USA. 94p.

Urbonavičiūtė, A., Jakštas, V., Kornyšova, O., Janulis, V., and Maruška, V. 2006. Capillary electrophoretic analysis of flavonoides in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. Journal of Chromatography 1112:339-344.

Chang, A., Zuo, Z., Chow, S.S. and Ho, W.K.K. 2006. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major)) fruits and hawthorn drink. Food Chemistry 98:426-430.

Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P.,

Valls, J., Richard, T., Trotin, F., Monti, J-P., Mérillon, J.-M. and Vitrac, X., 2007. Carbib-14 biolabeling of flavanols and chlorogenic acids in *Crataegus monogyna* cell suspension cultures. Food Chemistry doi 10.1016/j.foodchem.2006.11.065

Barrientos, V.A., López-Acevedo, A. 1995. Características hortícolas y viverísticas de tejocote (*Crataegus pubescens* (H.B.K.) de la república Mexicana. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Mex. 72 pp.

Haslam, E. 1996. Natural Polyphenols (vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. J. Nat. Prod. 59:205-215.

Sokół-Łętowska, Oszmiański, J. Wojdyło, A., 2006. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. Food Chemistry 53:36-42.

Svedström, U. Vuorela, H. Kostianen, R., Laakso, I. and Hiltunen, R. 2006. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoides prior to high-performance liquid chromatographic analysis. J. Chromatography A. 1112:103-111

Özcan, M. Haciserferogullari, H. Marakoglu, T. and Arslan, D. 2005. Hawthorn (*Crataegus* spp) fruit: some physical and chemical properties. J. of Food Engineering 69:409-413.