

TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS, FLAVONOIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN THE FLOWERS OF *Crataegus* spp. FROM MÉXICO

COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES, FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LAS FLORES DE *Crataegus* spp. DE MÉXICO

Rosario García-Mateos^{1,4}, Leonor Aguilar-Santelises², Marcos Soto-Hernández^{3*}, Raúl Nieto-Angel⁴, Geoffrey Kite⁵

¹Departamento de Preparatoria Agrícola, ⁴Fitotecnía. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México (rosgar08@hotmail.com), (r.nietoangel@gmail.com). ²Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Iztapalapa, México, D.F. 09230. Iztapalapa, México. (lsante02@yahoo.com.mx). ³Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (msoto@colpos.mx). ⁵Royal Botanic Gardens, Kew. Richmond. Surrey UK. (gkite@kew.org).

ABSTRACT

There are a number of medicinally active phytochemicals isolated from hawthorn with most of the data generated in studies of those species that are native to Europe and Asia. Comparatively little is known about the North American, specifically the Mexican *Crataegus* species. The objective of this study was to evaluate phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of extracts of flowers from six Mexican accessions of *Crataegus* in order to contribute to the chemistry of the Germplasm Bank accessions at the Universidad Autónoma Chapingo. Antioxidant activity was evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method and the flavonoids were identified by HPLC-MS. Quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-rhamnoside, quercetin 3-O-rhamnosyl-(1→6)-glucoside and quercetin 3-O-rhamnosyl-(1→2)-[rhamnosyl-(1→6)]-glucoside were identified. Using the DPPH radical scavenging capacity assay, accessions 52 and 77 showed the greatest antioxidant activity ($IC_{50}=431.1\pm 27.2$ and $555.4\pm 8.0 \mu g mL^{-1}$). Only flavonoids glycosides were identified in all six species and the phenolics content was higher than flavonoids. There were not found differences in the phenolics total content.

Keywords: *Crataegus*, flavonoids, flowers, Mexican hawthorn, radical scavenging activity.

INTRODUCTION

Crataegus is a large genus of shrubs or trees from Eurasia and America. Species of *Crataegus* native to North America make

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: febrero, 2012. Approved: octubre, 2012.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 46: 651-662. 2012.

RESUMEN

Hay una serie de fitoquímicos medicinalmente activos aislados del espino (Tejocote), con la mayoría de los datos obtenidos de estudios sobre esas especies nativas de Europa y Asia. Comparativamente, poco se sabe acerca de las especies de América del Norte, específicamente la especie mexicana *Crataegus*. El objetivo de este estudio fue evaluar los compuestos fenólicos, flavonoides y la actividad antioxidante de extractos de flores de seis recolectas mexicanas de *Crataegus* para contribuir a la química de las recolectas del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo. La actividad antioxidante se midió con el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y los flavonoides se identificaron con HPLC-MS. La quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina 3-O-ramnósil-(1→6)-glucósido y quercetina 3-O-ramnósil-(1→2)-[ramnósil-(1→6)]-glucósido fueron identificadas. Usando la prueba de DPPH con capacidad de barrido de radicales, las recolectas 52 y 77 mostraron la mayor actividad antioxidante ($IC_{50} = 431.1\pm 27.2$ y $555.4\pm 8.0 \mu g mL^{-1}$). Sólo se identificaron glucósidos de flavonoides en todas las seis especies y el contenido de fenólicos fue mayor que los flavonoides. No se encontraron diferencias en el contenido total de compuestos fenólicos.

Palabras clave: *Crataegus*, flavonoides, flores, espino mexicano, capacidad de barrido de radicales.

INTRODUCCIÓN

Crataegus es un vasto género de arbustos o árboles de Eurasia y América. Las especies de *Crataegus* originarias de América del Norte representan aproximadamente la mitad de todas

up approximately half of all known species of the genus (Phipps *et al.*, 2003). In México exists 13 species known as “tejocote” (Phipps, 1997; 1998). The plants are also known by various local names such as “manzanita”, “manzanilla” and “carasu” in Tarasco (Michoacan state), “belohui” in Zapoteco (Oaxaca state) and “pedyi” in Mazahua (Estado de México), and these often do not correspond to species (Martínez, 1979).

In México, there is an increasing interest in under-utilized species, also known as minor, secondary or alternatives species, and it is the case of tejocote (Nieto-Angel, 2007). Tejocote has several traditional medicinal uses: flowers, leaves and fruits being used to treat ailments such as heart or cough problems. However, in México the medicinal properties of tejocote have not been fully investigated.

The wide diversity and genetic variability of tejocote in México is represented by 166 accessions maintained by the Germplasm Bank of the Universidad Autónoma Chapingo, México (Pérez-Ortega *et al.*, 2004; Nuñez-Colín *et al.*, 2008). Using 37 morphological variables 92 accessions were grouped in five (Nieto-Angel, 2007; Nieto-Angel *et al.*, 2009); but no detailed taxonomic, phytochemical or molecular studies have been performed. According to Phipps (1997), there are difficult taxonomic problems in Mexican *Crataegus*.

Phytochemical investigations of the *Crataegus* genus have centered on the identification of phenolic compounds and flavonoids (Liu *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2012). They are used as taxonomic markers because the patterns tend to be species specific; they are also used to recognize new varieties (Van Sumere *et al.*, 1993; Iwashina, 2000). For example, ecotypes of *Crataegus azarolus* collected in different regions of Italy showed variation in the sugar phenolic content of their fruits (Bignami *et al.*, 2003). The presence of phenolic compounds justifies in part the pharmacological activity reported for *Crataegus* (Craig, 1999; Chang *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2006). Beneficial effects are attributed to the main active constituents, its flavonoid and proanthocyanidin components (Chang *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011). Various species of *Crataegus* are used in Europe and Asia for their medicinal properties (Ody, 1993; Craig, 1999; Chang *et al.*, 2002). Chinese hawthorn (*Crataegus*

las especies conocidas de este género (Phipps *et al.*, 2003). En México hay 13 especies conocidas como “tejocote” (Phipps, 1997; 1998). Las plantas también se conocen localmente como manzanita, manzanilla y carasu en tarasco (estado de Michoacán), belohui en zapoteco (estado de Oaxaca) y pedyi en mazahua (Estado de México), y estos nombres no corresponden a las especies (Martínez, 1979).

En México hay un creciente interés en las especies subutilizadas, también conocidas como menores, secundarias o alternativas, y es el caso del tejocote (Nieto-Angel, 2007). El tejocote tiene varios usos medicinales tradicionales: flores, hojas y frutos se utilizan para tratar dolencias, como problemas al corazón o tos. Sin embargo, en México las propiedades medicinales del tejocote no se han investigado plenamente.

La gran diversidad y variabilidad genética del tejocote en México está representada por 166 recolectas que tiene el Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, México (Pérez-Ortega *et al.*, 2004; Nuñez-Colín *et al.*, 2008). Con 37 variables morfológicas, se clasificaron 92 recolectas en cinco grupos (Nieto-Angel, 2007; Nieto-Angel *et al.*, 2009), pero no se han realizado estudios taxonómicos, fitoquímicos o moleculares detallados. Según Phipps (1997), hay problemas taxonómicos difíciles en la especie mexicana *Crataegus*.

Las investigaciones fitoquímicas del género *Crataegus* se han centrado en la identificación de compuestos fenólicos y flavonoides (Liu *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2012). Ellos se usan como marcadores taxonómicos porque los patrones tienden a ser específicos de especie; también se usan para reconocer nuevas variedades (Van Sumere *et al.*, 1993; Iwashina, 2000). Por ejemplo, los ecotipos de *Crataegus azarolus* recolectados en diferentes regiones de Italia mostraron variación en el contenido fenólico de azúcar de sus frutos (Bignami *et al.*, 2003). La presencia de compuestos fenólicos justifica, en parte, la actividad farmacológica reportada en relación a *Crataegus* (Craig, 1999; Chang *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2006). Los efectos beneficiosos se atribuyen a los principales constituyentes activos, sus componentes flavonoides y de proantocianidinas (Chang *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011). Varias especies de *Crataegus* se usan en Europa y Asia por sus propiedades medicinales (Ody, 1993; Craig, 1999; Chang *et al.*, 2002). Los extractos del espinillo chino (*Crataegus pinnatifida*) tienen efectos beneficiosos, como

pinnatifida) extracts have beneficial effects, such as antioxidants, anti-inflammatory and hypo lipidemic (Cui *et al.*, 2006), especially on the cardiovascular system (Chang *et al.*, 2002), as well as positive effects on the brain and vascular endothelium (Zhang *et al.*, 2002). *Crataegus* spp. are used for treatment of heart failure, hypertension, atherosclerosis, angina pectoris, indigestion, and abdominal distension (Chang *et al.*, 2002). The leaves, fruit, and flowers are used for improving the pumping capacity of heart and for treating angina, causing dilation of the smooth muscles of the coronary vessels, thereby increasing blood flow and reducing the tendency for angina (Craig, 1999). These beneficial effects are attributed to its flavonoid and proanthocyanidin components (Chang *et al.*, 2002).

The aim of this study was to determine the total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of crude flower extracts from six Mexican accessions of *Crataegus* spp. in order to contribute to the chemistry of the Germplasm Bank accessions at the Universidad Autónoma Chapingo. The hypothesis was that the composition profiles of phenolic compounds of flowers are different in the Mexican species comparing with those of Europe and Asia.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Flowers of *tejocote* were obtained from the Germplasm Bank of the Universidad Autónoma Chapingo, México (19° 29' N and 98° 53' W, and 2240 m altitude; García, 1988). The climate is C(Wo) (w)b (I')g, with moderate rain, temperate and the driest of the sub humid climates, with rains in summer; the mean annual temperature is 17.8 °C and the annual rainfall is 644.8 mm (García, 1988).

Preparation of extracts

Flower samples were taken randomly from six accessions (probable specie) representative of the five groups in the Germplasm Bank (Nieto-Angel, 2007; Nieto-Angel *et al.*, 2009). Then 1 g of ground and dried sample was weighed, and each one was suspended in 20 mL 95 % ethanol. After 24 h, the volume was adjusted to 25 mL with 80 % ethanol, and the mixture was centrifuged at 1409 g.

antioxidantes, anti-inflamatorios e hipolipidémicos (Cui *et al.*, 2006), especialmente sobre el sistema cardiovascular (Chang *et al.*, 2002), así como efectos positivos en el cerebro y el endotelio vascular (Zhang *et al.*, 2002). Los *Crataegus* spp. se usan para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la hipertensión, la aterosclerosis, angina de pecho, indigestión y distensión abdominal (Chang *et al.*, 2002). Las hojas, frutos y flores se usan para mejorar la capacidad de bombeo del corazón y el tratamiento de la angina de pecho, causando dilatación de los músculos lisos de los vasos coronarios, lo que aumenta el flujo sanguíneo y reduce la tendencia de la angina de pecho (Craig, 1999). Estos efectos beneficiosos se atribuyen a sus componentes flavonoides y proantocianidinas (Chang *et al.*, 2002).

El objetivo de este estudio fue determinar los compuestos fenólicos totales, los flavonoides y la actividad antioxidante de los extractos crudos de flores de seis recolectas mexicanas de *Crataegus* spp., para contribuir a la química de las recolectas del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo. La hipótesis fue que los perfiles de la composición de los compuestos fenólicos de las flores son diferentes en las especies mexicanas comparados con los de Europa y Asia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia vegetal

Las flores de *tejocote* se obtuvieron del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, México (19° 29' N y 98° 53' O, y 2240 m de altitud; García, 1988). El clima es C (Wo) (w) b (I ') g, con lluvia moderada, templado y el más seco de los climas subhúmedos, con lluvias en verano, la temperatura media anual es 17.8 °C y la precipitación anual es 644.8 mm (García, 1988).

Preparación de extractos

Las muestras de flores se tomaron al azar de seis recolectas (especies probables) representativas de los cinco grupos del Banco de Germoplasma (Nieto-Angel, 2007; Nieto-Angel *et al.*, 2009). Luego 1 g de muestra seca y molida se pesó, y cada una fue suspendida en 20 mL de etanol de 95 %. Después de 24 h el volumen se ajustó a 25 mL con 80 % de etanol, y la mezcla se centrifugó a 1409 g.

Quantification of total phenols

The total phenols content was quantified according to the method proposed by Waterman and Mole (1994). The concentration was obtained from a standard curve based on phenol ($y = 0.0014x$; $R^2=0.997$). Results were expressed as mg of phenol equivalent per 1 g of dry tissue.

Quantification of total flavonoids

An aliquot of the ethanolic extract (0.5 mL) was mixed with 1.5 mL of 95 % ethanol, 0.1 mL of 10 % $AlCl_3$, 0.1 mL of 1M potassium acetate and 2.8 mL of distilled water. After 30 min at room temperature the absorbance was obtained, at 415 nm, and a standard curve ($y=0.0122x - 0.0067$; $R^2=0.965$) was obtained using quercetin (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA) as standard. Results were expressed as quercetin equivalents (mg of quercetin equivalent per 1 g of dry weight). The analyses were carried out in triplicate (Chang *et al.*, 2002).

Identification of flavonoids by HPLC-MS

Analyses were performed using a Thermo Scientific HPLC-MS (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) system consisting of autosampler, pumps and PDA and a LCQ classic ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), fitted with an API source. Chromatography was performed on a 150×4.6 mm i.d., $5 \mu m$ Phenomenex Luna C18 column (Torrance CA, USA), using a 1 mL min^{-1} linear mobile phase gradient of 20 to 50 % aqueous methanol (containing 1 % acetic acid) in 30 min. The compounds were identified by interpretation of their mass spectra, through the MS/MS Library View™ Software (AB Sciex, Foster City CA, USA) and using an in-house library of MS/MS spectra of flavonoid aglycones, compiled from authentic standards (Cuychens and Claeys, 2004).

Antioxidant activity

The analysis was made following the method proposed by Amico *et al.* (2008), which is based on the transformation of the DPPH*(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) as stable radical to reduced DPPH, reaction was monitored at 515 nm by the gradual color change (purple to yellow), which increases gradually according to the number of electrons accepted (Cotelle *et al.*, 1996).

Ten g of dry flowers were suspended in 100 mL of 80 % methanol, left for 48 h at 20 °C, filtered and the extract was evaporated to dryness in a Büchi evaporator R-210® (Flawil, Switzerland) and lyophilized in a freeze dryer Labconco, Mod

Cuantificación de los fenoles totales

El contenido de fenoles totales se cuantificó de acuerdo con el método propuesto por Waterman y Mole (1994). La concentración se obtuvo a partir de una curva estándar basada en fenol ($y=0.0014x$; $R^2=0.997$). Los resultados se expresaron en mg de fenol equivalente a 1 g de tejido seco.

Cuantificación de los flavonoides totales

Una alícuota del extracto etanólico (0.5 mL) se mezcló con 1.5 mL de 95 % de etanol, 0.1 mL de 10% de $AlCl_3$, 0.1 mL de 1 M de acetato de potasio y 2.8 mL de agua destilada. Después de 30 min a temperatura ambiente se obtuvo la absorbancia a 415 nm, y también una curva estándar ($y=0.0122x-0.0067$; $R^2=0.965$) usando quercetina (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, EE.UU.) como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina (mg de quercetina equivalente por 1 g de peso seco). Los análisis realizaron por triplicado (Chang *et al.*, 2002).

Identificación de los flavonoides por HPLC-MS

Los análisis se realizaron usando un Thermo Scientific HPLC-MS (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), que consta de un inyector automático, bombas y PDA y un espectrómetro de masas con trampa de iones LCQ clásico (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), provisto de una fuente API. La cromatografía se realizó en una columna Phenomenex Luna C18 (Torrance CA, EE.UU.), de 150×4.6 mm i.d., y 5 mm, usando un gradiente lineal de 1 mL min^{-1} de 20 a 50 % de metanol acuoso (que contiene 1 % de ácido acético) en 30 min. Los compuestos se identificaron mediante la interpretación de sus espectros de masas, a través del MS/MS Library View™ Software (AB Sciex, Foster City CA, EE.UU.) y usando una biblioteca de espectros MS/MS de agliconas de flavonoides, compilado desde estándares auténticos (Cuychens y Claeys, 2004).

Actividad antioxidante

El análisis se realizó con el método propuesto por Amico *et al.* (2008), basado en la transformación del DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidracilo, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EE.UU.) como radical estable para DPPH reducido. La reacción se monitoreó a 515 nm, por el cambio gradual de color (púrpura a amarillo), que aumenta gradualmente de acuerdo con el número de electrones aceptados (Cotelle *et al.*, 1996).

Se suspendieron 10 g de flores secas en 100 mL de metanol 80 %, y se dejaron 48 h a 20 °C; se filtraron y el extracto se

75034 (Labconco, Co. Missouri, USA). Prior to the analysis of the antioxidant activity, both the solution of DPPH* and of the sample were maintained in an ice bath. To calculate the 50 inhibitory concentration (IC_{50}) three concentrations (1.0, 0.5 and 0.1 mg mL⁻¹ in methanol) of each extract were prepared; 0.1 mL of each solutions was mixed with 3.9 mL of 0.1 mM DPPH*. Immediately, zero time and after 30 min reading were made, at 515 nm, in a Spectronic 20® spectrophotometer (Rochester, NY, USA). Quercetin solution (1.0 mg mL⁻¹) was used as positive control. The low absorbance of the reaction mixture showed high antioxidant activity.

The initial concentration of DPPH* radical in methanol was controlled for every experiment from a calibration curve ($y=0.016x+0.033$; $R^2=0.994$) made by measuring the absorbance at 515 nm of standard DPPH* solutions at different concentrations (Amico *et al.*, 2008). The percentage of DPPH* was calculated with the formula: $\% \text{ DPPH}^* = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) * 100 / A_{\text{control}}$, where A_{control} is the control absorbance (DPPH* 0.1 mM), A_{sample} is the absorbance obtained after 30 min of each sample with 0.1 mM DPPH*. To calculate the IC_{50} , a linear regression was performed of the calibration curve (% of DPPH* vs. concentration of the added extract). IC_{50} values are concentration of the sample required to scavenge 50 % free radical DPPH.

Statistical analysis

This study consisted of six accessions with three replicates each one. A replication consisted of three samples of flowers from the same tree (experimental unit). An ANOVA was performed and means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$) by means of SAS (1996).

RESULTS AND DISCUSSION

Quantification of phenols and flavonoids

Content of phenols was higher than flavonoids (Table 1). Bahorum *et al.* (1994) observed the same behavior in extracts of *C. monogyna*. Content of phenolic compounds was not statistically different within accessions ($p > 0.05$) (Table 1). Results (7.77-14.87 mg g⁻¹ dry weight) were similar to that in flowers of seven species from Europe and Asia (0.45 – 10.14 mg g⁻¹ dry weight) (Edwards *et al.*, 2012).

The flavonoid content (2.85-7.23 mg g⁻¹ dry weight) was lower than in 12 European species (3.18 - 19.4 mg g⁻¹ dry weight) (Edwards *et al.*, 2012). A tendency of the flavonoids content was not observed within origin and type of accession. Edwards *et al.*

evaporó hasta secarse en un evaporador Büchi R-210® (Flawil, Suiza), y se liofilizó en un liofilizador Labconco, Mod 75034 (Labconco, Co. Missouri, EE.UU.). Antes del análisis de la actividad antioxidante, la solución de DPPH* y la de la muestra se mantuvieron en un baño de hielo. Para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), se prepararon tres concentraciones (1.0, 0.5 y 0.1 mg mL⁻¹ en metanol) de cada extracto; 0.1 mL de cada solución se mezcló con 3.9 mL de DPPH* 0.1 mM. Se hicieron lecturas: al tiempo cero y después de 30 min, a 515 nm, en un espectrofotómetro Spectronic 20® (Rochester, NY, EE.UU.). Una solución de quercetina (1.0 mg mL⁻¹) se usó como testigo positivo. La absorbancia baja de la mezcla mostró una actividad antioxidante alta.

La concentración inicial del radical DPPH* en metanol se controló para cada experimento desde una curva de calibración ($y=0.016x+0.033$; $R^2=0.994$) obtenida al medir la absorbancia a 515 nm de las soluciones estándares de DPPH*, a diferentes concentraciones (Amico *et al.*, 2008). El porcentaje de DPPH* se calculó con la fórmula: $\% \text{ DPPH}^* = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) * 100 / A_{\text{control}}$, donde A_{control} es la absorbancia de control (DPPH* 0.1 mM); A_{muestra} es la absorbancia obtenida después de 30 min de cada muestra con 0.1 mM DPPH*. Para calcular IC_{50} , se realizó una regresión lineal de la curva de calibración (% de DPPH* vs. la concentración del extracto añadido). Los valores IC_{50} son la concentración de la muestra requerida para secuestrar 50 % de los radicales libres DPPH.

Análisis estadístico

Este estudio consistió en seis recolectas con tres repeticiones cada una. Una repetición tenía tres muestras de flores del mismo árbol (unidad experimental). Se realizó un ANDEVA y se compararon las medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando SAS (1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de los fenoles y flavonoides

El contenido de fenoles fue mayor que el de los flavonoides (Cuadro 1). Bahorum *et al.* (1994) observaron el mismo comportamiento en los extractos de *C. monogyna*. El contenido de compuestos fenólicos no fue estadísticamente diferente dentro de las recolectas ($p > 0.05$) (Cuadro 1). Los resultados (7.77 a 14.87 mg g⁻¹ de peso seco) fueron similares a los de las flores de siete especies de Europa y Asia (0.45 a 10.14 mg g⁻¹ de peso seco) (Edwards *et al.*, 2012).

El contenido de flavonoides (2.85 a 7.23 mg de g⁻¹ peso seco) fue menor que en 12 especies europeas

Table 1. Phenols and flavonoids content in flowers of six accessions of *Crataegus* spp. (n= 3).**Cuadro 1. Contenido de fenoles y flavonoides en flores de seis accesiones de *Crataegus* spp. (n=3).**

Accession	Origin	Species	Phenols [†]	Flavonoids [†]
2	Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	13.27 ± 3.41 a [‡]	3.10 ± 0.47 d
6	Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	14.87 ± 1.88 a	4.90 ± 0.44 c
11	Puebla	<i>C. mexicana</i>	11.02 ± 0.48 a	2.85 ± 0.09 d
48	Puebla	<i>C. mexicana</i>	7.77 ± 1.25 a	7.23 ± 0.08 a
52	Chiapas	<i>C. nelsoni</i>	8.68 ± 0.23 a	4.37 ± 0.18 c
77	Chiapas	<i>C. nelsoni</i>	14.30 ± 1.00 a	6.13 ± 0.10 b

[†]mg g⁻¹ dry mass ♦ mg g⁻¹ de peso seco.

[‡]Values with different letters in a column are significantly different (p≤0.05) ♦ Los valores con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (p≤0.05).

(2012) pointed out the wide variability of flavonoid content on hawthorn within and between species. Flavonoid content was highest in accessions 48 and 77 and lowest in accession 11 (Table 1). The difference in flavonoid content is possibly due to the presence of procyanidins or other phenolic acids as described by Cui *et al.* (2006) and Liu *et al.* (2011) for fruits of *C. pinnatifida* containing procyanidins (19.7 %), phenols (1.27 % chlorogenic acid) and flavonoids (0.48 %). Bignami *et al.* (2003) report similar results of total flavonoids and phenols content in five accessions of *C. azarolus* L. flowers. The environmental factors do not seem to influence the phenolic compounds content among species and accessions analyzed, and the variations of the metabolites may be of genetic origin (Bignami *et al.*, 2003). There is no relationship between the total phenolic content and the antioxidant activity of berry, fruit wines and liquors (Robards *et al.*, 1999), a fact which should be taken into account when interpreting the results of any study, because some others metabolites can contribute to this activity. Therefore, it is useful to associate individual phenolic compounds with antioxidant activity because their particular structural characteristics can easily neutralize free radicals (Bors *et al.*, 1990; Cotelle *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999).

In our study the highest percentage of flavonoids was 0.72 %, close to the values described by Chang *et al.* (2002) and by Melikoglu *et al.* (2004) in leaves and flowers of *Crataegus* spp. and *C. microphylla* (0.7 %). According to Chang *et al.* (2002), flavonoid content varies from 0.1 to 1.0 % in *Crataegus* sp. fruits and from 1 to 2 % in leaves and flowers, which could be due to the method of extraction and analysis. However, the variation in the content of these

(3.18 a 19.4 mg de peso seco g⁻¹) (Edwards *et al.*, 2012). No se observó una tendencia del contenido de flavonoides en el origen y tipo de accesión. Edwards *et al.* (2012) señalaron la gran variabilidad de contenidos de flavonoides en el espino dentro de las especies y entre ellas. El contenido de flavonoides fue más alto en las recolectas 48 y 77 y menor en la 11 (Cuadro 1). La diferencia en el contenido de flavonoides posiblemente se debe a la presencia de procianidinas u otros ácidos fenólicos, según describen Cui *et al.* (2006) y Liu *et al.* (2011) para frutos de *C. pinnatifida* que contienen procianidinas (19.7 %), fenoles (1.27 % de ácido clorogénico) y flavonoides (0.48 %). Bignami *et al.* (2003) reportan resultados similares en el contenido de los flavonoides y fenoles totales en cinco recolectas de flores de *C. azarolus*. Los factores ambientales parecen no influir en el contenido de compuestos fenólicos entre las especies y recolectas analizadas, y las variaciones de los metabolitos pueden ser de origen genético (Bignami *et al.*, 2003). No hay relación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante, de bayas, vinos de frutas y licores (Robards *et al.*, 1999), lo cual debería considerarse al interpretar los resultados de cualquier estudio, debido a que otros metabolitos pueden contribuir a esta actividad. Por lo tanto, es útil asociar los compuestos fenólicos individuales con la actividad antioxidante debido a que sus características estructurales particulares pueden fácilmente neutralizar los radicales libres (Bors *et al.*, 1990; Cotelle *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999).

En este estudio, el porcentaje más alto de flavonoides fue 0.72 %, próximo a los valores descritos por Chang *et al.* (2002) y por Melikoglu *et al.* (2004) en hojas y flores de *Crataegus* spp. y *C. microphylla* (0.7 %). Según Chang *et al.* (2002), el contenido

metabolites therein some *Crataegus* species may be related to environmental conditions. The phenolic composition of fruits is determined by genetic and environmental factors but may be modified by oxidative reactions during processing and postharvest (Robards *et al.*, 1999). Kirakosyan *et al.* (2003; 2004) found high levels of phenolic compounds in leaves of *C. laevigata* and *C. monogyna* grown under drought and cold stress conditions.

Identification of flavonoids by HPLC-MS

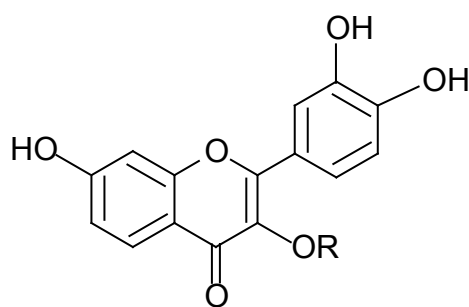
The analysis by HPLC-MS allowed to tentatively identify four glycosides of quercetin (Figure 1; Table 2). Using soft ionization techniques such as electrospray with serial mass spectrometry, the molecular mass and product ion spectrum of the aglycone moiety of a flavonoid *O*-glycoside can be obtained relatively easily, particularly in positive ion mode, and the aglycone spectrum can be compared with those of standards in a mass spectral library. All accessions showed the typical UV spectra of quercetin 3-*O*-glycosides, and serial MS analysis confirmed quercetin as the aglycone. Glycosides 1, 3 and 4 have not been reported in *Crataegus* from America. Flavonoid 2 was confirmed as rutin (quercetin 3-*O*-rhamnosyl-(1→6)-glucoside) against

de flavonoides varía de 0.1 a 1.0 % en los frutos de *Crataegus* sp. y de 1 a 2 % en hojas y flores, lo cual podría deberse al método de extracción y análisis. Sin embargo, la variación en el contenido de estos metabolitos en algunas especies de *Crataegus* puede estar relacionada con las condiciones ambientales. La composición fenólica de frutos está determinada por factores genéticos y ambientales, pero puede ser modificada por reacciones oxidantes durante el procesamiento y la poscosecha (Robards *et al.*, 1999). Kirakosyan *et al.* (2003, 2004) encontraron niveles altos de compuestos fenólicos en las hojas de *C. laevigata* y *C. monogyna* cultivados bajo condiciones de sequía y frío.

Identificación de los flavonoides por medio de HPLC-MS

El análisis con HPLC-MS hizo permitió identificar provisionalmente los cuatro glucósidos de quercetina (Figura 1, Cuadro 2). El uso de técnicas de ionización suaves tales como el electrospray- espectrometría serial de masas, la masa molecular y el espectro de masas de la fracción aglicona de un flavonoide *O*-glucósido pueden obtenerse con relativa facilidad, especialmente en el modo de ion positivo, y el espectro de la aglicona se puede comparar con los de estándares de una biblioteca de espectros de masas. Todas las recolectas revelaron los típicos espectros UV de quercetina 3-*O*-glucósidos, y el análisis serial MS confirmó la quercetina como la aglicona. Los glucósidos 1, 3 y 4 no se han reportado en la *Crataegus* de América. El flavonoide 2 se confirmó como rutina (quercetina 3-*O*-ramnosil-(1→6)-glucósido) frente a un estándar, y se supuso que la glucosa era también principalmente azúcar glicosídico en el mono hexosido 3, y el glucósido ramificado tri 1, quercetina – triglycosido no está reportado en el género *Crataegus* (Liu *et al.*, 2011). El espectro de masas de 1 coincidió como quercetina 3-*O*-ramnosil-(1→2) - [ramnosil (1→6)]-glucósido a través de una biblioteca de espectros. Además el análisis de los espectros de MS/MS, a través de la Biblioteca View TM Software (de AB Sciex, Foster City CA, EE.UU.), permitió confirmar estas observaciones. El flavonoide 4 mostró la pérdida de 146 después del análisis MS/MS y así fue asignado como quercetina 3-*O*-ramnósido (quercitrina).

La quercetina está presente en las especies europeas *C. microphylla*, *C. oxyacantha*, *C. sinaica* y *C.*



Metabolite	Sugar
Quercetin	R = H
1	R = Rham-Rham-Glu-
2	R = Rham-Glu-
3	R = Glu-
4	R = Rham-

Figure 1. Structures of glycosides of quercetin in flowers of *Crataegus* spp.

Figura 1. Estructuras de glucósidos de quercetina en flores de *Crataegus* spp.

Table 2. Retention times and m/z values of the base ion $[M+H]^+$ of flavonoid glycosides in the flowers of *Crataegus* spp.
Cuadro 2. Tiempos de retención y valores m/z del ion base $[M+H]^+$ de glucósidos flavonoides en las flores de *Crataegus* spp.

No.	Flavonoid	$[M+H]^+$ (m/z)	Retention time (min)
1	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnosyl-(1→2)-[rhamnosyl-(1→6)]- glucoside	757.0	8.27
2	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnosyl-(1→6)-glucoside (rutin)	611.0	9.91
3	Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside	465.0	10.15
4	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside	449.0	11.14

a standard, and it was assumed that glucose was also primary glycosidic sugar in the mono hexoside 3 and the branched tri glycoside 1, quercetin-triglycoside have not been reported in *Crataegus* genus (Liu *et al.*, 2011). The serial MS spectra of 1 matched as quercetin 3-*O*-rhamnosyl-(1→2)-[rhamnosyl(1→6)]-glucoside in an in-house spectral library. Besides the analysis of the MS/MS spectra through the Library View™ Software (from AB Sciex, Foster City CA, USA) allowed to confirm these observations. The flavonoid 4 showed the loss of 146 following MS/MS and so was assigned as quercetin 3-*O*- rhamnoside (quercitrin).

Quercetin is present in the European species *C. microphylla*, *C. oxyacantha*, *C. sinaica* and *C. monogyna* (Rehwald *et al.*, 1994; Shahat *et al.*, 2002; Melikoglu *et al.*, 2004). Furthermore, Urbonaviciute *et al.* (2006) and Zhang *et al.* (2001) suggested that rutin is commonly detected in *C. monogyna*. Rohr *et al.* (1999) identified by HPLC (-)-epicatechin and several procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers, whereas Danguet *et al.* (1993) identified some derivatives of kaempferol and other flavonoids from bee pollen of *C. monogyna*. Vitexin-2''-*O*-rhamnoside, acetylvitexin-2''-*O*-rhamnoside, rutin, hyperoside, vitexin, and chlorogenic acid are found in leaves and flowers of *C. monogyna* (Rehwald *et al.*, 1994). Fong and Bauman (2002) point out that the composition profile of phenolics in European hawthorn species also suggest that flavonoids were the markers for the differentiation of *C. monogyna*, *C. laevigata*, and *C. pentagyna* from one another.

The flavonoid glycosides 1-4 differed qualitatively or quantitatively between the six accessions. Accessions 2 and 6, as well as 52, had the same flavonoids but their relative abundance was different (Table 3). Also these accessions showed four glycosides and they had greatest relative abundance of quercetin 3-*O*-rhamnoside and accessions 11

monogyna (Rehwald *et al.*, 1994; Shahat *et al.*, 2002; Melikoglu *et al.*, 2004). Además, Urbonaviciute *et al.* (2006) y Zhang *et al.* (2001) sugirieron que la rutina se detecta frecuentemente en *C. monogyna*. Rohr *et al.* (1999) identificaron por medio de HPLC (-)-epicatequina y varias procianidinas en hojas y flores de *Crataegus*, mientras que Danguet *et al.* (1993) identificaron algunos derivados de kaempferol y otros flavonoides de polen de abeja de *C. monogyna*. La vitexina- 2''-*O*-ramnósido, acetylvitexin-2''-*O*-ramnósido, rutina, hiperósido, vitexina, y el ácido clorogénico están presentes en hojas y flores de *C. monogyna* (Rehwald *et al.*, 1994). Fong y Bauman (2002) señalan que el perfil de los compuestos fenólicos en las especies de espino europeas también sugiere que los flavonoides son los marcadores para distinguir entre *C. monogyna*, *C. laevigata*, y *C. pentagyna*.

Los glucósidos flavonoides 1-4 difirieron cualitativa o cuantitativamente en las seis recolectas. Las recolectas 2 y 6, así como la 52, tuvieron los mismos flavonoides pero su abundancia relativa fue diferente (Cuadro 3). También estas recolectas revelaron la presencia de cuatro glucósidos y tuvieron la mayor abundancia relativa de quercetina 3-*O*-ramnósido, y las recolectas 11 (58 %), 48 (54 %) y 77 (66 %) mostraron mayor abundancia relativa de rutina. Estas recolectas revelaron la presencia de sólo tres glucósidos (1, 2, y 3), y su perfil de flavonoides fue diferente a las de Europa y Asia (Rehwald *et al.*, 1994; Kirakosyan *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2006).

El glucósido 4 fue el más abundante en las recolectas 2 (58 %) y 6 (88 %) probablemente debido a que pertenecen a la misma especie (*C. stipulosa*) y tienen el mismo origen (Chiapas). El glucósido 2 se encontró en mayor proporción en las recolectas 11 (58%) y 48 (54 %) de *C. mexicana*, de Puebla. En las recolectas 52 y 77 de *C. nelsoni* los glucósidos 4 y 2 fueron los más abundantes (62 y 66 %) y vienen de

(58 %), 48 (54 %) and 77 (66 %) showed greatest relative abundance of rutin. These accessions showed only three glycosides (1, 2, and 3), and its flavonoids profile was different to those of Europe and Asia (Rehwalder *et al.*, 1994; Kirakosyan *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2006).

Glycoside 4 was the most abundant in the accessions 2 (58 %) and 6 (88 %) probably due to the fact that they belong to the same specie (*C. stipulosa*) and have the same origin (Chiapas). Glycoside 2 was found in higher proportion in the accessions 11 (58 %) and 48 (54 %) of *C. mexicana*, from Puebla. In the accessions 52 and 77 of *C. nelsoni* the glycosides 4 and 2 were the most abundant (62 and 66 %) and they come from Chiapas. These differences could be due to a genetic factors (similar within species) and not to their origin (Bignami *et al.*, 2003). Edwards *et al.* (2012) point out that this discrepancy indicate the need for a long-term phytochemical study performed using a validated analytical method, and involves looking at the chemistry of a single species collected from multiple locations over a number of years. Such study may answer the question of whether previously reported concentration values vary as a result of species, location, seasonality, or research methodology. It would also allow for quantitative determination of chemotaxonomic differences between the species.

Antioxidant activity

The antioxidant activity of extracts is due, in part, to the quercetin, but the presence of flavones and procyanidins, not studied in the present work, also might contribute to this activity (Robards *et*

Chiapas. Estas diferencias podrían deberse a factores genéticos (similares dentro de las especies) y no a su origen (Bignami *et al.*, 2003). Edwards *et al.* (2012) señalan que esta discrepancia indica la necesidad de realizar un estudio fitoquímico de largo plazo utilizando un método analítico validado, y consistiría en observar la química de una sola especie recolectada en diversos lugares durante varios años. Dicho estudio podría responder a la pregunta de si los valores de concentración ya reportados varían dependiendo de la especie, la ubicación, la estación del año, o la metodología de investigación. También permitiría determinar cuantitativamente las diferencias quimio-taxónicas entre las especies.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se debe en parte a la quercetina, pero la presencia de flavonas y procianidinas, no estudiada en el presente trabajo, también podría contribuir a esta actividad (Robards *et al.*, 1999; Harborne y Williams 2000; Chang *et al.*, 2002). Al respecto, la actividad antioxidante de los flavonoles y flavonas se relaciona con su estructura química. Las moléculas con grupos de hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B y OH en C-3 permiten estructuras estables y eficientes para capturar radicales libres, un requisito para obtener la máxima capacidad antioxidante (Bors *et al.*, 1990; Cotelle *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999). En este caso, la quercetina, que tiene un grupo 3,5,7,3', 4'-pentahidroxi, mostró una mayor actividad DPPH eliminadora de radicales libres que el kaempferol; éste tiene un grupo 3,5,7,4'-tetrahidroxi, en el anillo B del esqueleto flavonol, que podría aumentar la actividad radical

Table 3. Relative abundance of flavonoids and antioxidant activity in flowers of *Crataegus* spp.
Cuadro 3. Abundancia relativa de los flavonoides y la actividad antioxidante en las flores de *Crataegus* spp.

Sample	Flavonoids noted (relative abundance of base ion)	DPPH (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Quercetin	—	97.203 a [†]	220.7 $\pm$ 4.8 d
Accession 2	1 (6), 2 (26), 3 (9), 4 (58)	61.437 b	724.3 $\pm$ 16.2 a
Accession 6	1 (1), 2 (4), 3 (6), 4 (88)	93.870 a	585.3 $\pm$ 15.9 b
Accession 11	1 (9), 2 (58), 3 (33), 4 (0)	92.620 a	606.6 $\pm$ 8.6 b
Accession 48	1 (9), 2 (54), 3 (37), 4 (0)	79.730 ba	692.3 $\pm$ 6.7 a
Accession 52	1 (6), 2 (22), 3 (10), 4 (62)	94.350 a	431.1 $\pm$ 27.2 c
Accession 77	1 (0), 2 (66), 3 (34), 4 (0)	88.663 a	555.4 $\pm$ 8.0 b

[†]Values with different letters in a column are significantly different ($p \leq 0.05$) ♦ Los valores con letras diferentes en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

al., 1999; Harborne and Williams 2000; Chang *et al.*, 2002). To this respect, the antioxidant activity of flavonols and the flavones is associated with their chemical structure. Those molecules with hydroxyl groups in 3' and 4' positions of the B ring and OH in C-3 permit stable and efficient structures to capture free radicals, a requirement for the maximum antioxidant capacity (Bors *et al.*, 1990; Cotellet *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999). In this case, quercetin having a 3,5,7,3',4'-pentahydroxy group showed stronger DPPH radical scavenging activity than kaempferol; this has 3,5,7,4'-tetrahydroxy group, in the B-ring of flavonol skeleton, which might enhance DPPH radical reducing activity (Rice-Evans *et al.*, 1996; Okawa *et al.*, 2001). It is important to mention that some of the glycoside derivatives present lower antioxidant activity than the aglycones, since the hydroxy group at C-3 in 3-O-glycoside may not contribute to scavenge the DPPH radical (Okawa *et al.*, 2001). This information explains the moderate antioxidant activity found in relation to the glycosides structure in the present study.

Pharmacokinetic studies indicate that the sugar fraction in the quercetin is important because retards its absorption due to the fact that the flavonol is absorbed well in the small intestine, whereas rutin is absorbed in the colon, after intestinal bacteria hydrolysis (Harborne and Williams, 2000).

Other studies indicate properties of the glycosides of quercetin; for instance higher spasmolytic activity than of quercetin has been demonstrated, due to its effect on the relaxation of the skeletal muscle. Additionally, numerous physiological effects beneficial to human health are attributed to the flavonoids as anticancer agents. Their action *in vitro* with low density lipoproteins inhibits the development of vascular diseases when they are consumed in a diet of fruits and vegetables (Rice-Evans *et al.*, 1996; Okawa *et al.*, 2001; Schramm and German, 1998).

In this study were analyzed the type of flavonoids present in species of *Crataegus* found in Mexico. Furthermore, the profile and the abundance of the flavonoids detected in six accessions of the Germplasm Bank of the Universidad Autónoma Chapingo, Mexico, will contribute to the chemistry of the 92 accessions morphologically characterized. Analysis of more accessions of the different plant species would be necessary to determine whether

DPPH eliminadora (Rice-Evans *et al.*, 1996; Okawa *et al.*, 2001). Es importante mencionar que algunos de los derivados glucósidos presentan menor actividad antioxidante que las agliconas, ya que el grupo hidroxilo en C-3 en 3-O-glucósido no puede contribuir a captar el radical DPPH (Okawa *et al.*, 2001). Esta información explica la actividad antioxidante moderada que se encontró en relación con la estructura de glucósidos en el presente estudio.

Los estudios farmacocinéticos indican que la fracción de azúcar en la quercetina es importante porque retarda su absorción debido a que el flavonol se absorbe bien en el intestino delgado, mientras que la rutina se absorbe en el colon después de la hidrólisis bacteriana intestinal (Harborne y Williams, 2000).

Otros estudios indican propiedades de los glucósidos de quercetina; por ejemplo, mayor actividad espasmolítica, debido a su efecto sobre la relajación del músculo esquelético. Además, numerosos efectos fisiológicos beneficiosos para la salud humana se atribuyen a los flavonoides como agentes anticancerígenos. Su acción *in vitro* con lipoproteínas de baja densidad inhibe el desarrollo de enfermedades vasculares cuando se consumen en una dieta de frutas y verduras (Rice-Evans *et al.*, 1996; Okawa *et al.*, 2001; Schramm y German, 1998).

En este estudio, se analizó el tipo de flavonoides presentes en especies de *Crataegus* que se encuentran en México. Además, el perfil y la abundancia de los flavonoides detectados en seis recolectas del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, México, contribuirá a la química de las 92 recolectas morfológicamente caracterizadas. Sería necesario analizar un mayor número de recolectas de las diferentes especies de plantas para determinar si estas diferencias son específicas de la especie o se deben a variaciones entre individuos (Edwards *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

No hay diferencias en el contenido de fenoles totales dentro de las recolectas; tampoco se observó alguna tendencia sobre el contenido de flavonoides en el origen y el tipo de accesión. El contenido de fenoles totales fue similar a los de las flores de las siete especies de Europa y Asia. Se detectaron cuatro glucósidos de flavonoides en las flores de las especies mexicanas de *Crataegus* y proporcionaron evidencia de la actividad antioxidante de los extractos de flores.

these differences were species specific or due to inter-individual variation (Edwards *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

There are not differences in the content of total phenolics within accessions; it was not observed a tendency of the content of flavonoids within the origin and the type of accession neither. The content of total phenolics was similar to those of the flowers on seven species from Europe and Asia. Four flavonol glycosides were detected in flowers of Mexican species of *Crataegus* and provide evidence of the antioxidant activity of the extracts of flowers. The flowers of one accession presented the higher antioxidant activity and contrasts to the other accessions. This is the first report of composition and content of phenolic compounds and profile of flavonoids in the flowers of *Crataegus* spp. from Mexico.

LITERATURE CITED

- Amico, V., R. Chillemi, S. Mangiafico, C. Spatafora, and C. Tringali. 2008. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* 99: 5960-5966.
- Bahorum T., F. Trotin, J. Pommery, J. Vasseur, and M. Pinkas. 1994. Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med.* 60: 323-328.
- Bignami, C., M. Paolucci, A. Scossa, and G. Bertazza. 2003. Preliminary evaluation of nutritional and medicinal components of *Crataegus azarolus* fruits. *Acta Hort.* 597:95-100.
- Bors, W., W. Heller, C. Michel, and S. Manfred. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355.
- Chang, C., M. Yang, H. Wen, and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 176-182.
- Chang, Q., Z. Zuo, F. Harrison, and M. S. Chow. 2002. Hawthorn. *J. Clin. Pharmacol.* 42: 605-612.
- Cotelle, N., J. Bernier, J. Catteau, J. Pommery, J. Wallet, and E. M. Gaydou. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Bio. Med.* 20: 35-43.
- Craig, W. J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (Suppl.): 491S-499S.
- Cui N., K. Nakamura, S. Tian, H. Kayahara, and Y. Tian. 2006. Polyphenolic content and physiological activities of Chinese Hawthorn extracts. *Biosci. Biotech. Biochem.* 70: 2948-2956.
- Cuychens, F., and M. Claeys. 2004. Mass spectra in the structure analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39: 1-15.
- Dauguet, J. C., M. Bert, J. Dolley, A. Bekaert, and G. Lewin. 1993. 8-methoxykaempferol, 3-neohesperidoside and other flavonoids from pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochemistry* 33: 1503-1505.
- Edwards, J. E., P. N. Brown, N. Talent, T. A. Dickinson and P. R. Shipley. 2012. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 79: 5-26.
- Fong, H. H. S., and J. L. Bauman. 2002. Hawthorn. *J. Cardiovasc. Nurs.* 16: 1-8.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen. Editorial UNAM. México, D. F., México. 246 p.
- Harborne, J. B., and C. A. Williams. 2000. Review advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Iwashina, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* 113: 287-299.
- Kirakosyan, A., P. Kaufman, S. Warbe, S. Zick, K. Aaronson, S. Bolling, and S. Ch. Chang. 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiol. Plantarum* 121: 182-186.
- Kirakosyan, A., E. Seymour, P. B. Kaufman, S. Warber, S. Bolling, and S. Ch. Chang. 2003. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J. Agr. Food Chem.* 51: 3973- 3976.
- Liu, P., H. Kallio, and B. Yang. 2011. Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruits ripening. *J. Agric. Food Chem.* 59: 11141-11149.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D. F., México. 1247 p.
- Melikoglu, G., L. Bitis, and A. H. Mericli. 2004. Flavonoids of *Crataegus microphylla*. *Nat. Prod. Res.* 18: 211-213.
- Nieto-Ángel, R. 2007. Colección, conservación y caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). In: Nieto-Ángel, R. (ed). *Frutales Nativos, un Recurso Fitogenético de México*. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, México. pp: 25-107.
- Nieto-Ángel, R., S. A. Pérez-Ortega, C. A. Nuñez-Colín, J. Martínez-Solís, and F. González-Andrés. 2009. Seed and endocarp traits as markers of the biodiversity of regional sources of germoplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from Central and Southern México. *Scientia Horticulturae* 121 (2): 166-170.
- Núñez-Colín, C. A., R. Nieto-Ángel, A. F. Barientos-Priego, S. Segura, J. Sahagún-Castellanos, y C. González-Andrés. 2008. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, Subfam. Meloideae) en México. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 14: 177-184.

—Fin de la versión en Español—



- Ody, P. 1993. The Herb Society's Complete Medicinal Herb. Dorling Kindersley Publishing. New York, USA. 192 p.
- Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara, and M. Ono. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biol. Pharm. Bull. 24: 1202-1205.
- Pérez-Ortega, S. A., C. A. Núñez-Colín, R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, y S. Segura. 2004. Los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp.) en México. Variación eco-climática. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 48: 149-151.
- Phipps, J. B. 1997. Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, Subfam. Maloideae). Sida Botanical Miscelany No. 15. Botanical Research Institute of Texas, Inc. USA. 94 p.
- Phipps, J. B. 1998. Introduction to the red fruited hawthorns (*Crataegus*, Rosaceae) of western North America. Can. J. Bot. 76: 1863-1899.
- Phipps, J. B., R. J O'Kennon and R.W. Lance 2003. Hawthorns and Medlars. Timber Press, Inc. Portland, OR. 139 p.
- Rehwald, A., B. Meier, and O. Stichler. 1994. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. J. Chromatogr. A 677: 25-33.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio. Med. 20: 933-956.
- Robards, K., P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, and W. Glover. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem. 66: 401-436.
- Rohr, G., B. Meier, and O. Stichler. 1999. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers. J. Chromatogr. A 835: 59-65.
- SAS (Statistical Analysis System). 1996. SAS/STAT User's Guide (Release 6.12.). SAS Institute Inc., Cary, N. C. 1028 p.
- Schramm, D. D., and J. B. German. 1998. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. J. Nutr. Biochem. 9: 560-566.
- Shahat, A., P. Cos, T. De Bruyne, S. Apers, F. M. Haammouda, S. I. Ismail, S. Azzam, M. Claeys, E. Goovaerts, L. Pieters, D. V. Berghe, and A. J. Lietinck. 2002. Antiviral and antioxidant of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. Planta Med. 68: 539-541.
- Urbonaviciute, A., V. Jakstas, O. Kornysova, V. Janulis, and A. Maruska. 2006. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. J. Chromatogr. A 1112: 339-344.
- Van Sumere, C. F., L. De Colman L., E. Everaert, D. De Keukeleire, and K. Vande Castele. 1993. Phenolic markers in chemotaxonomy and plant cultivar recognition. In: Scarlbert, A. (ed). Polyphenolic Phenomena INRA Editions. Paris, France. pp: 257-266. .
- Waterman, P. G., and S. Mole. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- Zhang, Z., Qi Chang, M. Zhu, Y. Huang, W. K. K. Ho, and Z. Y. Chen. 2001. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. J. Nutr. Biochem. 12: 144-152.
- Zhang, Z., W. K. K. Ho, Y. Huang, A. E. Jame, L. W. Lam, and Z. Y. Chen. 2002. Hawthorn fruit is hypolipidemic in rabbits fed a high cholesterol diet. J. Nutr. 132: 5-10.