



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE EN UNA BEBIDA FERMENTADA DE
TEJOCOTE (*Crataegus mexicana*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Ing. A. Cecilia González Jiménez

Director

Dr. Daniel Méndez Iturbide

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2016.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE EN UNA BEBIDA FERMENTADA DE
TEJOCOTE (*Crataegus mexicana*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Ing. A.Cecilia González Jiménez

Comité Tutoral

Dr. Daniel Méndez Iturbide

Director

Dra. Estela Cuevas Romero

Tutor interno.

M. en C. Antonio Nieto Camacho

Tutor externo.

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2016.

Hoja de financiamiento:

El lugar donde se realizó el trabajo de tesis es el Laboratorio de Química de los Alimentos, de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Av. Xicohtencatl N° 466, Barrio San Nicolás, San Pablo del Monte 90920, Tlaxcala, México. Tel/fax: 01222823917.

El proyecto de investigación fue financiado por fondos del CONACYT. De igual manera, por el apoyo financiero de una beca académica con una beca académica con número de becario de: 333181. La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Cecilia González Jiménez** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "**Evaluación antioxidante en una bebida fermentada de Tejocote (*Crataegus mexicana*)**".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

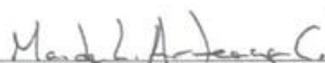
ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 1 DE 2016


DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE


DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO


M. EN C. ANTONIO NIETO CAMACHO


DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ


DRA. MARIA DE LOURDES ARPEAGA CASTAÑEDA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradobcuaat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

Agradecimientos.

- La sustentante y el grupo de investigación que participaron para la realización del siguiente proyecto, agradecen al Posgrado del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC, UAT).
- Al CONACYT, por el apoyo de la beca académica para realizar estudios de posgrado con número de becario 333181 y CVU 635407.
- Quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Daniel Méndez Iturbide, por el apoyo incondicional, interés y dedicación en el proyecto.
- Del mismo modo, doy gracias a la Dra. Estela Cuevas Romero por su dedicación e interés en este proyecto de investigación.
- Así mismo, doy gracias al M. en C. Antonio Nieto Camacho por el esfuerzo y tiempo para acompañarme en cada uno de mis tutorales.
- Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda, por su dedicación e interés en este proyecto de investigación.
- Dr. Rubén Díaz Godínez, le agradezco su gran aporte a mi trabajo de investigación, por ser un excelente docente en el aula y excelente tutor.

A todos ellos, gracias por haberme permitido ser su alumno, brindarme su amistad y buenos consejos.

Agradecimientos a título personal

Quiero agradecer infinitamente al Dr. Serafín Ortíz Ortíz, por su apoyo incondicional en cada uno de mis proyectos, por creer en mí y siempre impulsarme a seguir adelante. Es un gran ejemplo a seguir.

De igual forma, agradezco al Dr. Daniel Méndez Iturbide, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo en el Laboratorio de Química de los Alimentos, por su tiempo, sus regaños y correcciones en cada uno de mis tutorales. Gracias por sus consejos y por su tiempo.

Agradezco al Dr. Rodolfo Ortíz Ortíz, por ser parte de nuestra vida y familia. Siempre apoyándome.

Dra. Arely Flores Morales, por enseñarme el camino de la investigación.

Dedicatoria

Primeramente, agradezco a Dios por prestarme vida, a la que ha llenado de bendiciones y logros. Entre ellos está la culminación de este proyecto.

Este arduo trabajo está dedicado, especialmente, a mi hija, Isabella que es el motor que me impulsa día a día para ser mejor profesionista y persona. Espero que esto te sirva como ejemplo hija mía. Sin tu presencia jamás me hubiera esforzado tanto. Te amo pedacito de mí.

A mi madre, mujer llena de amor, inteligencia, perseverancia. Porque siempre confiaste en mí. Cuando me quería dar por vencida jamás dejaste que me callera. Te amo madre mía. Eres mi gran ejemplo de mujer.

A mi padre, por siempre estar al pie del cañón, apoyando cada uno de mis proyectos. Por ayudarme a resolver mis ejercicios de Biotecnología.

A mi abuelito Eliseo (papito) † por siempre cuidarme desde allá arriba, me encantaría tenerte acá junto a mí, para compartir este logro. Siempre te llevo en mi corazón.

A mi abuelita Ceci, otro gran ejemplo de mujer, siempre confiando en mí. Te amo tanto mi viejita.

Nuevamente al Dr. Serafín Ortíz Ortíz, gran ejemplo a seguir. Estoy agradecida por su apoyo en cada proyecto que emprendo, por siempre tener un espacio para escucharme aunque que está muy ocupado. Me quedo sin palabras para seguir agradeciendo su apoyo.

Al Dr. Rodolfo Ortíz Ortíz, otro gran ejemplo a seguir, gracias por las visitas tan agradables en el laboratorio, por su preocupación en mi proyecto de maestría y por formar parte de mi vida.

Al Ing. Guillermo, por prestarme su tiempo y apoyarme en mis fermentaciones.

A mi hermana Carolina, por cuidarme a mi Ale cuando realizaba mis experimentos y tesis. Te amo nena.

Doy gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Química de los Alimentos Navid, Marlen, Leo, Anylu, Rosalba. Gracias por los buenos momentos así como sus consejos.

Resumen

Considerando que en la naturaleza existen compuestos antioxidantes que pueden inhibir los procesos de óxido reducción en el organismo humano, es importante evaluar el papel de los antioxidantes naturales que contrarresten dichos procesos. Estudios han demostrado que extractos de acetona derivados de la cáscara del tejocote posee un contenido químico con una fuerte actividad antioxidante, probados en varios modelos *in vitro*. Por lo tanto, se espera que sometido a un proceso biológico de fermentación, conserve esta propiedad. El propósito de este trabajo fué evaluar la actividad antioxidante en una bebida alcohólica fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) e identificar los metabolitos bioactivos antioxidantes por las técnicas DPPH, ABTS, TBARS, así como la identificación de los metabolitos HPLC- masas. La bebida alcohólica fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) alcanzó 12% Alc. Vol., el porcentaje de la actividad antioxidante evaluada por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) conservó un $84 \pm 3.65 \%$, $95.32 \pm 3.35 \%$ por ABTS (Ácido 2,2 azinobis-3-etilbenzotiazonil-6-sulfónico) y $95.32 \pm 0.02\%$ de inhibición de lipoperoxidación en TBARS. El metabolito identificado en la bebida fermentada de tejocote, presenta una relación de masa carga de $577 m/z$, la cual, mediante una búsqueda bibliográfica coincidió con Procianidina B2. Con base en los resultados anteriores, es posible concluir que el fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) sometido a un proceso biológico de fermentación, es capaz de conservar la actividad antioxidante.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estrés Oxidativo.....	3
1.2. Radicales libres.....	4
1.3. Mecanismos de formación de radicales libres.....	6
1.4. Clasificación de los radicales libres.....	7
1.5. Antioxidantes naturales.....	7
1.6. Clasificación de los antioxidantes.....	8
1.7. Flavonoides: polifenoles.....	8
1.7.1. Estructura.....	9
1.8. Estructura y función de los flavonoides.....	11
1.9. Inhibición de la lipoperoxidación por acción de los flavonoides.....	12
1.10. Técnicas de separación.....	13
1.10.1. Técnicas de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	13
1.10.2. Espectrometría de masas.....	14
1.11. Vino tinto: bebida alcohólica fermentada.....	15
1.11.1. Composición y propiedades del vino tinto.....	15
1.11.2. Los componentes fenólicos del vino tinto.....	15
1.11.3. Preparación del mosto.....	16
1.11.4. Desarrollo de la fermentación del vino tinto.....	16
1.11.5. Caracterización de las cepas de levaduras.....	17
1.11.6. La fermentación malo-láctica.....	17
1.11.7. Inhibición del crecimiento bacteriano.....	17
1.12. La cerveza: bebida alcohólica fermentada.....	18
1.12.1. Fabricación y materia prima para la elaboración de la cerveza.....	19
1.12.2. El mosto y la fermentación alcohólica de la cerveza.....	19
1.12.3. La fermentación primaria de la cerveza.....	20
1.12.4. Fase de crecimiento y fermentación de la cerveza.....	21

2. ANTECEDENTES	23
2.1. El Tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>) y su actividad antioxidante.....	23
2.2. Datos del laboratorio de nutrición de la UAT.....	26
2.3. Bebidas alcohólicas fermentadas y su capacidad antioxidante.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
6. METODOLOGÍA	34
6.1. Reactivos y solventes.....	34
6.1.1. Agentes químicos y soluciones para DPPH.....	34
6.1.2. Agentes químicos y soluciones para ABTS.....	34
6.1.3. Agentes químicos y soluciones para TBARS.....	34
6.1.4. Agentes químicos y soluciones para HPLC- masas.....	35
6.1.4.1. Condiciones cromatográficas del laboratorio de cromatografía del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.....	35
6.1.4.2. Agentes químicos y soluciones para HPLC del Laboratorio de Química de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.....	35
6.2. Recolección del fruto de tejocote (<i>C. mexicana</i>).....	36
6.3. Fermentación alcohólica del fruto de tejocote (<i>C. mexicana</i>) en medio natural.....	36
6.4. Fermentación del fruto de tejocote (<i>C. mexicana</i>) con levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial.....	36
6.5. Neutralización de radicales libres por DPPH.....	37
6.6. Neutralización del radical ABTS.....	37
6.7. Determinación de la inhibición de la lipoperoxidación con la técnica de TBARS.....	38
6.8. Identificación de metabolitos bioactivos presentes en el fermentado de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>).....	42
6.8.1. Cuantificación de metabolitos por HPLC- masas del Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.....	42
6.8.2. Cuantificación de metabolitos por HPLC en el Laboratorio de Química de los Alimentos de la Licenciatura de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.....	44
7. RESULTADOS	45

7.1. Recolección del fruto.....	45
7.2. Fermentación del fruto de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>) en medio natural y evaluación de actividad antioxidante.....	46
7.2.1. Fermentación alcohólica 72 horas y evaluación de actividad antioxidante.....	46
7.2.2. Fermentación alcohólica 120 horas y evaluación de actividad antioxidante.....	48
7.2.3. Fermentación alcohólica de cerveza artesanal en un medio artificial con levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Dry Ale Yeast US 05).....	49
7.3. Fermentación del fruto de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>) con levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial.....	52
7.4. Evaluación de la actividad antioxidante en medio artificial.....	53
7.4.1. Neutralización de radicales libres por DPPH.....	53
7.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante del fermentado de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>) neutralizando al radical ABTS.....	55
7.4.3. Determinación de la inhibición de la lipoperoxidación con la técnica de TBARS.....	58
7.5. Identificación de metabolitos bioactivos presentes en el fermentado de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>).....	60
7.5.1 Cuantificación de metabolitos por HPLC- masas del Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.....	60
7.5.2 Cuantificación de metabolitos por HPLC de la muestra del fermentado de tejocote en medio artificial, en el Laboratorio de Química de los Alimentos de la Licenciatura de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.....	62
8. DISCUSIÓN.....	66
9. CONCLUSIONES.....	70
10. PERSPECTIVA.....	71
11. BIBLIOGRAFÍA.....	72
12. ANEXOS.....	79

1. INTRODUCCIÓN

De manera habitual el oxígeno, se encuentra en su forma más estable con los electrones que forman el enlace (p), antienlazante con el mismo espín, y se le conoce como estado triplete. Sin embargo, por razones puramente químicas, enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos), que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. El estrés oxidativo, se define, como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen la pérdida del balance entre radicales libres y los antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, a favor de los radicales libres (Konigsberg, 2008).

Para contrarrestar los efectos de los radicales libres, las células producen su propio sistema antioxidante por medio de enzimas. Se ha demostrado en estudios clínicos, que el consumo de antioxidantes naturales de frutos y vegetales disminuye el estrés oxidante como: extractos de manzana con alto contenido de polifenoles, de igual manera con suplementos alimenticios ricos en antioxidantes (Céspedes y cols., 2008). Otro ejemplo, es el fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) en el que se ha evaluado la acción antioxidante de extractos de acetona y metanol de la cáscara de tejocote (Méndez y cols., 2013) así como valoración del extracto de tejocote en la inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos humanos (Banderas y cols., 2015).

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares. El vino tiene un alto contenido en compuestos polifenólicos, aproximadamente se conocen unos 500, la mayoría de los cuales provienen de la uva y del proceso fermentativo (Formica y cols., 1995).

La cerveza también contiene importantes cantidades de flavonoides entre los que destacan los polihidroflavanos (catequina y epicatequina), los antocianógenos (leucocianidina o leucopelargonidina) y los flavonoles (grupo de quercitinas: kaempferol o mirecitina) (Roos y cols., 2002).

Con base en lo anterior, en este proyecto evaluó *in vitro* la capacidad de atrapamiento de radicales libres y la inhibición de la lipoperoxidación del fruto de tejocote, (*Crataegus mexicana*) sometido a un proceso biológico de fermentación alcohólica. También se determinó el medio idóneo para desarrollar la fermentación alcohólica, sea un medio artificial o natural, el cual brinde buen sabor, olor y aroma; así como la identificación de el metabolito antioxidante polifenílico Procianidina B2. La hipótesis de este estudio, es que el fruto crudo de tejocote (*Crataegus mexicana*) presenta actividad antioxidante en varios modelos de cuantificación de forma consistente, por lo que se espera que la fermentación alcohólica del fruto conserve la actividad antioxidante.

1.1 Estrés Oxidativo

Dentro de los procesos de obtención de energía de los alimentos en el ser humano, se involucran procesos oxidativos- enzimáticos a nivel mitocondrial, (pérdida de electrones por parte de los alimentos y ganancia de electrones por parte del oxígeno molecular). Su producción se realiza principalmente, en la ubiquinona (coenzima Q), y el complejo I, NADH deshidrogenasa. Durante el proceso de reducción- oxidación se generan Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), se inicia con el O_2 , el cual acepta un electrón para dar origen al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) -poco reactivo con otros compuestos, como hierro libre, centros de hierro-azufre de varias proteínas, óxido nítrico, en menor grado reacciona con glutatión y ascorbato, no reacciona con NAD(P) H, bases nitrogenadas del ADN, aminoácidos de las proteínas y lípidos- posteriormente esta especie capta dos electrones y dos protones para dar origen al peróxido de hidrógeno H_2O_2 el cual al adicionarse un electrón y un protón más, genera una molécula de agua y un radical hidroxilo ($HO\cdot$) el cual, es el radical libre derivado del oxígeno más agresivo que se conoce y esto debido a que no tiene forma resonante electrónica alguna. Para neutralizar estas reacciones que causan daño, es importante que el sistema de defensa natural del cuerpo incluya varias enzimas y compuestos no enzimáticos como proteínas de transferencia, que secuestran metales prooxidantes que inhiben la aparición de las reacciones de óxido-reducción. En términos fisiológicos normales, debiera existir un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Lo que inicia como una producción fisiológica de oxidantes, debido a producción continua de productos secundarios de la respiración (EROS). Este fenómeno desencadena una respuesta, considerada normal, con la presencia de antioxidantes; principalmente endógenos. Este mecanismo de neutralización tendería a encontrar un equilibrio. Sin este, ya sea por el exceso de oxidantes o por la incapacidad del sistema antioxidante, se considera un estado de estrés oxidante. El daño oxidativo corresponde a la modificación (estructural y funcional) que el exceso de radicales libres ocasionan a las moléculas como ADN, proteínas y lípidos de la célula. Diversos factores endógenos y exógenos incrementan al estrés oxidativo y sus efectos en el organismo. Por ello, es importante la distinción entre estrés oxidante, el cual es una situación reversible, y el daño oxidativo como irreversible (Méndez y cols., 2014).

1.2 Radicales libres

Desde el punto de vista químico, los radicales libres, son especies con deficiencia de un electrón, dependiendo de la estructura; algunos radicales pueden ser muy inestables y buscan combinarse con otras especies que tengan alta disponibilidad de electrones para así lograr su estabilidad. Durante los procesos de obtención de energía en forma de ATP por oxidación de los alimentos se generan los radicales libres, el oxígeno acepta cuatro electrones para obtener como producto de oxidación agua y ATP (Geronikaki y cols., 2006).

Los radicales libres de oxígeno causan daño oxidativo y este se ha visto implicado en la patología de más de cien enfermedades crónico degenerativas como; cáncer, aterosclerosis, síndrome metabólico, inflamación crónica (Céspedes y cols., 2000). La vida del radical es muy corto (milisegundos), pero este proceso continúa como una reacción en cadena generando un desequilibrio en el cuerpo, en el siguiente cuadro se presenta el tiempo aproximado en que los radicales permanecen sin reaccionar. En un organismo normal la combustión química del metabolismo aerobio produce sustancias oxidantes altamente reactivas, tales como; anión superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , pueden ser generados por factores como la contaminación ambiental, consumo de tabaco, alimentos procesados, medicamentos o por la exposición a pesticidas. Actualmente se sabe que el estrés celular contribuye a procesos inflamatorios y difusión endotelial, considerando este último como el factor de riesgo principal de enfermedades cardiovasculares (Lien y cols., 2008). En la tabla 1, se puede observar la vida media de los principales radicales libres derivados de oxígeno.

Tabla 1. Tiempo aproximado de la vida media de los radicales libres (Lien y cols., 2008).

Especie		Vida media (seg)
Oxígeno molecular	O ₂	>10 ²
Oxígeno singulete	¹ O ₂	10 ⁻⁵
Anión superóxido	O ₂ ⁻	10 ⁻⁶
Radical hidroxilo	HO·	10 ⁻⁹
Radical peróxido	ROO·	7
Radical alcoxilo	RO·	10 ⁻⁶
Óxido nítrico	NO·	1-10
Peroxinitrico	ONOO·	0.05-1

Sin embargo, también tienen funciones protectoras en procesos de lesión ya que estos protegen a los tejidos dañados contra ataques de agentes patógenos y así evitar infecciones, este mecanismo de protección es utilizado por los linfocitos y macrófagos, es decir; las células anteriores generan y usan como herramienta a los radicales libres contra la membrana celular de las bacterias generando la lipoperoxidación. El proceso defensivo anterior es altamente eficiente y selectivo, sin embargo al tener desequilibrios en la neutralización de los radicales se generan procesos inflamatorios crónicos, daño a la célula por oxidación de su pared y desorden de tipo enzimático generalizado (Lien y cols.,2008).

Otras fuentes de producción en el ser humano, provienen por el humo de cigarro, ya que la combustión del tabaco, generan productos altamente oxidados, dando origen a radicales derivados del nitrógeno, azufre y oxígeno (ERO), los heteroátomos (N, S, O) forman radicales muy reactivos, los cuales se estabilizan con moléculas de alta densidad electrónica por ejemplo, lípidos, proteínas, ADN. En general el ser humano está expuesto a estos radicales libres de manera intensiva, incluso en el ambiente, por ejemplo, el proceso de foto-protección atmosférica de los rayos de alta energía emitidos por el sol, el sistema foto-protector de ozono-oxígenos generan ERO en forma de radicales. Por otra parte, los antioxidantes son moléculas

capaces de mitigar estas reacciones, donando electrones y así volviendo a las ERO menos reactivas en el organismo humano (Méndez y cols., 2014).

1.3 Mecanismos de formación de radicales libres

Se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical $\text{OH}\cdot$ que es generado siempre que el H_2O_2 entra en contacto con los iones cobre (Cu) o hierro (Fe); ya que el H_2O_2 y los complejos metálicos están presentes en humanos, es lógico asumir que el $\text{OH}\cdot$ puede ser formado *in vivo*. Los mecanismos de formación son tres; 1. Transferencia electrónica, en la que se produce la sección de un electrón a una molécula. 2. Pérdida de un protón de una molécula. 3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace (Loh y cols., 2006).

Por otra parte, más del 95% del O_2 consumido por las células en nuestro organismo es en un sistema acuoso, el citocromo oxidasa mitocondrial, lo reduce completamente a H_2O durante la respiración mitocondrial, pero un pequeño porcentaje (<5%) es convertida a ERO. Una vez formado el radical en reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de capturar el electrón de cualquier compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto, que llegue a afectar los tejidos corporales. El mecanismo de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial, que constituye la vía de formación de radicales libres derivados del oxígeno (Martínez, 1998).

1.4 Clasificación de los radicales libres

Los radicales libres de oxígeno se clasifican de la siguiente forma:

- 1.- Inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media corta; siendo el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo $\cdot OH$ (Kodja y cols., 1999).
2. Orgánicos o secundarios. Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Por ejemplo, óxido nítrico ($NO\cdot$) (Kodja y cols., 1999).
3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres de oxígeno. Son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, peroxinitrito, los peróxidos orgánicos (Kodja y cols., 1999).

1.5 Antioxidantes naturales

En la naturaleza, las plantas y animales que sirven de alimentos al ser humano contienen altos niveles antioxidantes. En años recientes se ha dado mayor importancia al consumo de frutas y vegetales por su contenido de antioxidantes (Torres y cols., 2011).

Recientes estudios, han demostrado que una dieta rica en frutas y verduras genera menor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas, como cataratas, asma y bronquitis. Esto debido a la presencia de antioxidantes, que son moléculas capaces de donar electrones, sea de forma enzimática o directa, teniendo como producto final, especies más estables y no reactivas a moléculas del ser humano. Por ejemplo, vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, selenio, etc., que interfieren con el daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos (Torres y cols., 2011).

Los extractos de manzana con alto contenido de polifenoles flavonoides, inhiben la lipoperoxidación en plasma humano (Valero y cols., 2011).

1.6 Clasificación de los antioxidantes

Si bien existen diferentes formas de clasificar a los antioxidantes, destacan los bio-sintetizados y los que se obtienen a través de la dieta.

Antioxidantes exógenos: vitamina E, vitamina C, β -carotenos, vitamina A, Selenio y Zinc los cuales deben ser aportados en nuestra alimentación diaria, actúan en las fronteras celulares, encerrando los radicales libres antes de producir daño (Shigh, 2008).

Antioxidantes endógenos o enzimáticos: Superóxido dismutasa; destruye y bloquea producción de radicales libres a partir del oxígeno. Glutation peroxidasa; bloquea la producción y destruye radicales procedentes de las grasas. Catalasa: Regula la producción de peróxido de hidrógeno (Shigh, 2008).

1.7 Flavonoides: polifenoles

Los fenoles son un grupo de compuestos no esenciales en la dieta, pero su bioactividad está relacionada con su capacidad de quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y neutralizar radicales libres. Los antioxidantes del tipo polifenólicos, se encuentran comúnmente en vegetales, pero sus concentraciones son más altas en las frutas. Los polifenoles pueden actuar como antioxidantes mediante la depuración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, mediante la quelación de iones metálicos de transición con actividad redox. También pueden tener efecto antioxidante indirecto por la inhibición de enzimas pro-oxidantes e inducción de enzimas antioxidantes (Coimbra y cols., 2006).

1.7.1 Estructura

Los flavonoides (*flavus*= amarillo) presentan complejas y variadas estructuras fenólicas. Se consumen regularmente un promedio de 23 mg/día, siendo fácilmente absorbidos por el humano los flavonoides glicosilados que las agliconas. Se encuentran en plantas y vegetales, responsables del color de frutos y hojas. Sustancias con bajo peso molecular son fenil-benzopironas (fenil cromonas), con variedad de estructuras basadas en un núcleo común de tres anillos con varias sustituciones. Se subdividen de acuerdo a la presencia de un grupo oxígeno en la posición 4, una doble unión entre los átomos de carbono 2 y 3, o en un grupo hidroxilo en posición 3 C del anillo (medio). Son típicos compuestos fenólicos y por tanto actúan como potentes quelantes de metales y radicales libres, siendo potentes antioxidantes. De igual forma se han utilizado para tratar el alcoholismo, enfermedades cardiovasculares, enfermedades crónicas, metabólicas y secuelas (Middleton y cols., 2000).

Su absorción en el organismo se debe a una ruptura de sus anillos por efecto de los microorganismos intestinales, produciendo demetilación y dehidroxilación de los ácidos fenólicos (derivados del ácido cinámico y fenoles simples), los microorganismos intestinales también poseen glicosidasas capaces de romper los flavonoides glicosilados en azúcares residuales. Los flavonoides también participan en reacciones de oxido-reducción (Redox), como en la metilación, glucoronidación, sulfonación. Por lo anterior, su absorción puede ser limitada y su detección en plasma también, ya que pueden ser degradados a sus subproductos. La aglicona diosmetina y quercetina pueden ser detectadas en plasma, pero no en orina, por lo que estos metabolitos también sufren degradación en hígado y posiblemente en otros órganos. De esta manera, es más conveniente suplementar una dieta con flavonoides glicosilados que con agliconas. Los efectos de los flavonoides en el sistema enzimático de las células animales ha sido documentado por varias investigaciones (Middleton y cols., 2000). A continuación tenemos los siguientes:

Kinasa: la proteína quinasa C (PKC) y la proteína tirosina quinasa (PTK) son inhibidas *in vivo* por ciertos flavonoides como la quercetina.

Fosfolipasa A₂: es inhibida por la quercetina, quercetagenina, kaemferol y escutellareina.

ATPasa: La quercetina inhibe el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana del eritrocito.

Lipo-oxigenasa: algunas benzoquinonas y flavonoides como la baicaleina inhiben estos sistemas quelando la lipo-oxigenasa.

Adenil ciclasa, transcriptasa, glutatión S-transferasa, hialuronidasa, aldehído y alcohol deshidrogenasa, amilasa, ADN y ARN polimerasa, citocromo P450, son inhibidas por flavonoides de diferentes tipos.

Linfocitos, células NK, macrófagos y monolitos, mastocitos y basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas, células endoteliales, células musculares, cardiacas, nerviosas.- Los flavonoides actúan como potentes antioxidantes en estas células.

Efectos endócrinos y metabólicos: Los flavonoides actúan inhibiendo o incrementando el efecto de las hormonas.

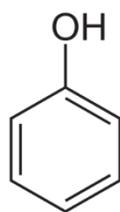
Efectos antivirales: Quercetina, morina, rutina, texifolina, apigenina, catequina, entre otros tienen efecto antiviral, incluyendo VIH.

Efectos antitóxicos, hepatoprotectores y citoprotectores: Silimarín protege contra la peroxidación lipídica y hemólisis en eritrocitos de rata, también disminuye la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos de pacientes alcohólicos.

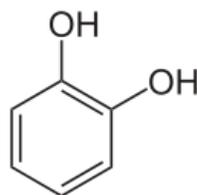
Actividad antioxidante: Las ERO pueden ser depuradas e inhibidas por la vitamina A, E Y β -caroteno que son excelentes antioxidantes, así como gran número de flavonoides (Middleton y cols., 2000).

1.8 Estructura y función de los flavonoides

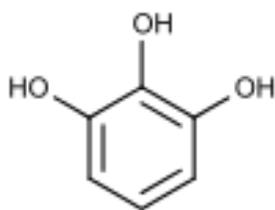
Debido a su composición molecular los flavonoides pueden funcionar como: agente reductor y quelante de metales, inhibidor de las ERO, antioxidante rompiendo la cadena de oxidación, evita la formación de oxígeno singulete, protector de ácido ascórbico, que a su vez protege a los flavonoides contra la degradación oxidativa. Los flavonoides reaccionan con el OH , y rompen la cadena de oxidación , siendo muy importantes en la conservación de tocoferoles en membranas biológicas. En todos estos casos, la quercetina parece ser un eficiente inhibidor de radicales libres, siendo miricetina la más activa (Middleton y cols., 2000).



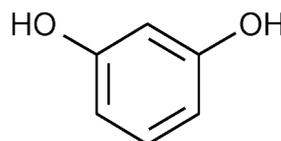
a) Fenol



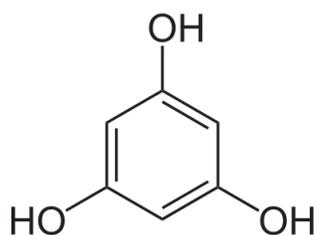
b) Pirocatecol



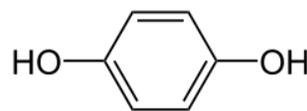
c) Pirogalol



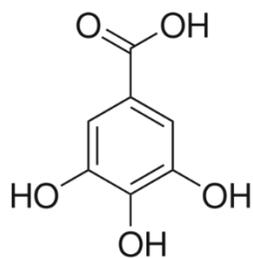
d) Resorcinol



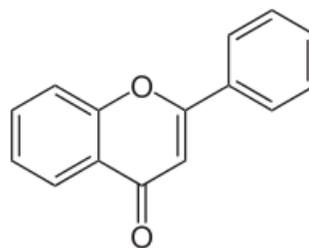
e) floroglucinol



f) Hidroquinona



g) Ácido gálico



h) Flavona

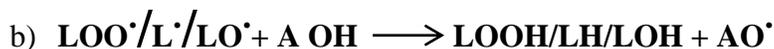
Figura 1. La estructura básica está dada por su anillo fenólico (a) y de acuerdo a su número de anillos y radicales OH se forman otro tipo de flavonoides polifenólicos b) pirocatecol, c) pirogalol, d) resorcinol, e) floroglucinol, f) hidroquinona, g) ácido gálico, h) flavona (Middleton y cols., 2000).

1.9 Inhibición de la lipoperoxidación por acción de los flavonoides

La peroxidación lipídica puede ser inhibida por los flavonoides, actuando como fuerte inhibidor del O_2^- (Bauman y cols., 1980) y atrapador de 1O_2 . Parece que por sí solo, no es capaz de iniciar la lipoperoxidación, siendo el HO^- (la forma protonada de O_2^-) la que aparentemente lo hace en los ácidos grasos poliinsaturados aislados. El papel del O_2^- parece ser menor en la lipoperoxidación. Esto parece ser iniciado por el OH y radicales metálicos libres de hierro y ferril. La peroxidación lipídica podría ser detenida en su estado de iniciación, inhibiendo los radicales libres, mientras que la cadena de propagación puede ser interceptada por inhibidores de radicales hidroxilo (PL) como son los antioxidantes fenólicos (figura 2a). Así como, la fase de terminación del radical lipídico ($L\cdot$), del radical lipoperóxido ($LOO\cdot$), y del radical alcoxil ($LO\cdot$) (figura 2b) (Halliwell y cols., 1990).



Donde Fl-OH es el flavonoide



Donde A-OH es el flavonoide (fenol) y AO es el radical fenoxil

Figura 2. a) Reacción antioxidante que rompe la cadena de peroxidación por acción de los flavonoides. b) Formación de la reiniciación de la peroxidación lipídica e inducida por iones metálicos (Halliwell y cols., 1990).

Como cualquier molécula rica en electrones, los flavonoides pueden presentar autooxidación. Por ejemplo, quercetina y miricetina. Esta genera la producción de O^{-2} , H_2O_2 y OH . Efectos de interés en el contexto de su capacidad de citotoxicidad (Canada y cols., 1990).

1.10 Técnicas de separación

1.10.1 Técnicas de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos. Una mejora introducida a la técnica de HPL, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase inversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua,

mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos (Castro y cols., 2004).

1.10.2 Espectrometría de masas

Es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso molecular y algunas veces la estructura del analito. En la espectrometría de masas la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad. Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducido a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos. Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito. Con la espectrometría de masas se proporciona información acerca de la composición elemental de las muestras, de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas, cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas, estructura y composición de superficies sólidas y relaciones isotópicas de átomos en las muestras (Hoffman y Stroobant, 2007).

1.11. Vino tinto: bebida alcohólica fermentada

Sus vestigios datan en Mesopotamia, Armenia, Egipto y Grecia. La etapa fundamental que constituye la fermentación alcohólica del jugo de uva permaneció sin explicación y por lo tanto sin control. La elaboración de los vinos se ha beneficiado de los progresos tecnológicos y de la mejora de los conocimientos bioquímicos y biotecnológicos; selección de las cepas, optimización de los parámetros de las fermentaciones, material de fermentación y filtración, etc. Según el tipo de vino deseado, el jugo de la uva puede ser objeto de varias fermentaciones. La fermentación alcohólica; etapa inicial de toda vinificación, permite transformar los azúcares de la uva en alcohol, anhídrido carbónico y diferentes compuestos que contribuirán al aroma del vino (Lichine, 1980).

1.11. 1 Composición y propiedades del vino tinto

La fermentación alcohólica constituye una de las etapas esenciales de la vinificación, conjunto de procesos que permite transformar el mosto de uva en vino. El mosto de uva, producto obtenido de los frutos de uva, constituye un excelente medio de cultivo para las levaduras. La riqueza en nitrógeno varía según la composición del terreno en el que se haya cultivado la uva y según su madurez. El pH se sitúa generalmente entre 3,0 y 3,5. El mosto contiene un cierto número de vitaminas, principalmente tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina e inositol (Borgeois, 1995).

1.11.2 Los componentes fenólicos del vino tinto

Diferentes compuestos fenólicos esenciales para la calidad del vino, proceden de los granos de uva como las antocianinas principalmente en la uva negra, flavonas en la uva blanca, taninos que aportaran al vino mayor o menor astringencia según su grado de polimerización. Los residuos del tratamiento de los viñedos, tales como los pesticidas, pueden igualmente tener una acción inhibitoria sobre la fermentación alcohólica. Un exceso de maduración de la uva provoca la disminución del nitrógeno asimilable y una inhibición por alcohol al final de la fermentación. La fermentación alcohólica se lleva a cabo por implantación de cepas puras de

levaduras pertenecientes generalmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Borgeois, 1995).

1.11.3 Preparación del mosto

Contrariamente a lo que es común en la mayor parte de las industrias de fermentación, no se procede a una esterilización del jugo de uva para destruir los microorganismos propios de la uva. Ya que, esta operación tendría como resultado la destrucción o modificación de los aromas del fruto. A partir del prensado, el jugo se trata generalmente en continuo con SO₂ que tiene como objetivo principal la limitación de la oxidación de los mostos. Este tratamiento tiene el objetivo de limitar el desarrollo de los microorganismos propios del jugo, a lo largo de los tratamientos de filtrado que precederá al comienzo de la fermentación del mosto. Las principales cepas contaminantes pertenecen a los géneros siguientes: *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*. Se han desarrollado ampliamente las levaduras secas activas, (L.S.A) para sembrar el cultivo puro del mosto filtrado. Generalmente se emplean secas o liofilizadas (Borgeois, 1995).

1.11.4 Desarrollo de la fermentación del vino tinto

La fermentación puede durar más de un mes si se realiza a baja temperatura 10° C, en un mosto que contenga entre 160 y 180 g/L de azúcar. Si la mayor parte del azúcar se transforma en alcohol y gas carbónico, aproximadamente un 10% se utilizará en otras vías tales como la fermentación gliceropiruvica y para la síntesis de diversos productos secundarios, tales como el ácido succínico y acético, 2-3 butanodiol, acetilmetilcarbinol. La mayor parte de las dificultades que se encuentran durante la transformación del mosto en vino son debidas a fermentaciones lentas, o a finales de fermentación difíciles. Estos problemas son debidos a la gran concentración de azúcar del mosto al principio de la fermentación y sobre todo a nivel elevado de alcohol al final de la fermentación. Paralelamente, los toneles de roble y las cubas de cemento vitrificado y acero esmaltado han desaparecido progresivamente para dejar paso a las cubas de acero inoxidable. Por una parte una limpieza y un mantenimiento más fácil y por otra parte un control de las temperaturas de fermentación. El instrumento empleado para medir el total de sacarosa (azúcar) disuelta en jugos de vinos es el refractómetro, y se representa

como grados Brix ($^{\circ}$ Bx). Una solución de 25° Bx tiene 25 gramos de azúcar (sacarosa) por 100 gramos de líquido o, dicho de otro modo, hay 25 gramos de sacarosa y 75 gramos de agua en los 100 gramos de la solución. Los $^{\circ}$ Bx miden la gravedad específica de un líquido (Boulton y cols., 1996).

1.11.5 Caracterización de las cepas de levaduras

Las cepas utilizadas para la fermentación alcohólica pertenecen esencialmente al género *Saccharomyces*, y la mayor parte a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se caracterizan por la capacidad de fermentar una cantidad importante de azúcar 200 g/L con finales de fermentación en medios ricos en alcohol de entre 10 y 13 % (Bourgeois, 1995).

1.11.6 La fermentación malo-láctica

Representa la transformación de ácido málico en ácido láctico y gas carbónico. Esta descarboxilación conlleva una sedimentación del vino y permite la eliminación de la acidez málica inestable. Esta degradación se obtiene por la acción de bacterias lácticas anaerobias. Además de una desedificación, dota al vino de una estabilidad biológica mayor en presencia una cantidad débil de anhídrido sulfuroso (Bourgeois, 1995).

1.11.7 Inhibición del crecimiento bacteriano

Se desarrolla generalmente en el vino tras la fermentación alcohólica. El vino es un medio muy desfavorable para el crecimiento de las bacterias lácticas, ya que los principales factores fisicoquímicos se encuentran en el límite de crecimiento bacteriano. La temperatura al final de la fermentación alcohólica es a menudo inferior a 20° C, y en ciertos casos próximos a 10° C, mientras que el óptimo se situará alrededor de 25° C. El pH del vino es muy bajo: de 3,0 a 3,5 según las regiones mientras que el óptimo está entre 4,5 y 4,8. El nivel de etanol en el vino es de 10 a 13 %. A estos niveles, el desarrollo de la mayor parte de las cepas de bacterias lácticas se encuentra bloqueado o inhibido. El anhídrido sulfuroso utilizado tras el prensado de la uva y en otras operaciones enológicas como antioxidante, tiene también un papel bactericida importante (Bourgeois, 1995)

1.12 La cerveza: bebida alcohólica fermentada

Otro tipo de bebida fermentada que se ha probado la presencia de actividad antioxidante, es la cerveza. Dicha propiedad es atribuida principalmente de la malta y lúpulo. La cerveza es fundamentalmente una bebida fermentada de cereales. Sus orígenes son muy antiguos ya que los sumerios ya la consumían 7.000 años antes de Cristo. La historia ha dado pruebas de su consumo en Babilonia, Mesopotamia y en el Egipto de los faraones. Parece que en una de sus formas primitivas fue una especie de pan fermentado. La fabricación de la cerveza a partir de la cebada, un cereal cultivado en climas muy variados, permitió su extensión fuera el mundo mediterráneo. Los celtas contribuyeron a su progreso utilizando granos germinados. La “*cerevisie*” era la bebida nacional de los galos y permaneció incluso tras la ocupación romana que fomentó el consumo del vino; su fabricación correspondía a las mujeres al igual que la cocción del pan. Posteriormente hacia el siglo X aparecieron cervecerías artesanales, en Normandía, Alsacia Flandes y en otras regiones de Europa. La innovación consistirá, a lo largo de los siglos siguientes, en la aromatización del producto dulzón, resultante de la fermentación del extracto de cereales con la ayuda de diversas plantas aromáticas amargas, hasta que el lúpulo, utilizado desde el siglo XI, se impone alrededor del siglo XIX que conoció la industrialización de la fabricación y el uso. Durante la segunda mitad del siglo XX corresponde a una nueva fase evolutiva muy importante para la industria cervecera, consistente en la concentración de la producción en un pequeño número de unidades, en la puesta a punto de instalaciones gigantes, en una cierta aceleración de las transformaciones bioquímicas que intervienen en la producción. Actualmente los avances de la genética comienzan a tener éxito en el área cervecera, probablemente en los próximos años se aplicarían importantes innovaciones relativas al componente microbiológico de la fabricación (Vogel, 2011).

1.12. 1. Fabricación y materia prima para la elaboración de la cerveza

La fabricación de la cerveza consiste esencialmente en fermentar el jugo azucarado extraído de los cereales y aromatizado por el lúpulo. La malta es el producto de la transformación en cebada especialmente seleccionada. Esta transformación comprende sucesivamente: una imbibición que rehidrata los granos, una fase de germinación controlada que causa la aparición de diversas enzimas, concretamente amilasas y proteasas, y al final una desecación y una torrefacción (calentamiento breve) que estabilizan el grano de malta y su contenido enzimático encargado de llevar a cabo a lo largo del malteado de la hidrólisis en moléculas de sacarosa del almidón de la malta. Por razones económicas a menudo también en sustitución parcial de la malta, “granos crudos”, es decir, cereales no germinados tales como maíz, arroz, trigo, cebada, donde el almidón será hidrolizado por los enzimas de la malta hidrolizada simultáneamente. El lúpulo tiene el papel de contribuir al aroma, concretamente aportando el amargor y también de inhibir a los contaminantes por sus propiedades antisépticas, se añade bien como inflorescencias femeninas nativas denominadas “conos”, bien como polvos o concentrados. La composición del agua influye fuertemente en la calidad de la cerveza producida, sin duda actuando sobre los procesos de extracción, transformación enzimática y precipitación, pero hoy en día puede ser adaptada en función del tipo de cerveza deseada (Vogel, 2011).

1.12.2 El mosto y la fermentación alcohólica de la cerveza

Antes de iniciar el proceso de fermentación alcohólica, la malta se muele hasta formar una harina con el fin de preservar las envolturas del grano que intervienen en la filtración. Esta harina se añade al agua de la mezcla en la cuba para dar lugar a un macerado. Un aumento de la temperatura a una velocidad apropiada con adecuados periodos de estabilización colocado a las enzimas en condiciones favorables; en algunas horas el almidón se transforma en azúcares fermentables y las proteínas en péptidos y aminoácidos, que constituirán la fuente nitrogenada necesaria para la levadura. El jugo obtenido por la filtración del macerado se introduce en una caldera donde se somete a ebullición y después se añade el lúpulo; la cocción posterior extrae e isomeriza las humulonas del lúpulo y precipita las sustancias coagulables bajo la forma

denominada “ruptura”. Su composición depende de numerosos parámetros, concretamente la cantidad de malta y de los granos crudos utilizados, que determinan la concentración en materia. Por ejemplo, un mosto corriente de cerveza “lager” contiene alrededor de 120 g de materia seca por litro, es decir, 85 g de azúcares fermentables, 30 g de dextrinas no fermentables, 2,5 g de aminoácidos y el complemento de sustancias y minerales diversas. Ahora bien, la fermentación se desarrolla en dos fases: a) La fermentación principal que dura en principio de 5 a 10 días a una temperatura comprendida entre 10 y 20° C y donde se realizan las transformaciones bioquímicas más importantes del mosto; termina con la floculación, es decir, la caída de la mayor parte de la levadura al fondo de las cubas (en fermentación “baja”). b) La fermentación secundaria o “grande” que dura de 2 a 8 semanas a una temperatura alrededor de 1°C y durante la cual la cerveza sufre transformaciones bioquímicas sutiles que reafirman su afinado y tratamientos enzimáticos destinados a asegurar su estabilidad coloidal al frío. Después la cerveza se filtra por una capa de diatomeas fósiles que la cifra y la hace brillante; en este punto se almacena a presión y en frío; finalmente se pasteuriza y se almacena bien en botellas, o bien en toneles (Vogel, 2011).

1.12.3 La fermentación primaria de la cerveza

Es la que asegura lo esencial de las transformaciones bioquímicas del mosto y concretamente la transformación de los azúcares en el alcohol. Su desarrollo depende de las propiedades de la cepa de levadura elegida, de su estado fisiológico, de la dosis, de las condiciones de siembra y de la temperatura. En lo que concierne al estado fisiológico, es preciso que el fermento tenga una elevada viabilidad. La siembra se realiza a dosis del orden de 500 g de levadura en pasta por hL, que equivale aproximadamente a 1 g de materia seca por litro o bien 25 millones de células por mL. La elevación moderada de este nivel de siembra que puede acelerar la fermentación pero de forma limitada ya que, la concentración de levadura producida es proporcional a la concentración del factor limitante del crecimiento, todo incremento en la dosis conlleva una reducción del factor multiplicador de la levadura y por tanto de su actividad. Al mismo tiempo los incrementos excesivos de la dosis inoculada pueden tener inconvenientes desde el punto de vista organoléptico. A lo largo de la fase de latencia de la cerveza, que dura alrededor de 24 h, la levadura no se multiplica, si bien permanece activa: el

oxígeno se elimina y se agota rápidamente, la absorción de aminoácidos y péptidos comienza y el porcentaje de nitrógeno en la célula aumenta, las sales minerales se absorben igualmente y el pH desciende. Todo esto tiene lugar sin que comience apreciablemente la fermentación ni el crecimiento; la levadura lleva a cabo los reajustes fisiológicos necesarios para el reinicio del crecimiento. Una buena atracción del mosto en la siembra reduce esta fase, que por otra parte está prácticamente ausente a partir de la primera generación, cuando el inóculo está formado de levadura resultante de una buena propagación (Vogel, 2011).

1.12.4 Fase de crecimiento y fermentación de la cerveza

El número de divisiones celulares es muy reducido en cervecería, debido posiblemente a la baja tasa de sustancias nitrogenadas asimilables en relación al inóculo; para una siembra media de 1 g seco/litro, es decir 25 millones de células por mL, se producen generalmente dos divisiones que elevan el número de células en suspensión a aproximadamente 10 células por mL. Dado el similar estado nutricional de las células al principio de la fermentación, estas divisiones son prácticamente simultáneas. A lo largo de esta fase la fermentación es activa, la absorción de los aminoácidos continúa y el pH sigue descendiendo. A continuación, seguirá una fase de fermentación sin crecimiento, donde la masa celular continúa creciendo debido a la acumulación de glucógeno. Los aminoácidos están prácticamente agotados, el pH se estabiliza; ésteres y alcoholes superiores aparecen al mismo tiempo que los azúcares se agotan lentamente, degradados por la fermentación. Al final de la fermentación se produce un fenómeno todavía poco conocido, la floculación; las levaduras se agrupan en agregados y sedimentan. Son recogidas, controladas y reutilizadas en breve tiempo para comenzar otra fermentación; se llevan a cabo controles de la pureza y de la viabilidad del fenómeno. Entre los factores que influyen en el desarrollo de la fermentación se pueden citar, además de la composición del mosto, la oxigenación y la temperatura. Es necesario por tanto airear el mosto al principio de la fermentación. Las necesidades varían en función de las cepas. Se suele saturar el mosto al principio, es decir, se añaden alrededor de 8 mg/L de O₂, pero el estudio de las relaciones cuantitativas entre la oxigenación de las levaduras y su tasa de lípidos ha conducido recientemente a la adición de 30 mg de oxígeno por gramo de levadura seca. La fermentación secundaria que se desarrolla durante varias semanas a una temperatura alrededor

de 1° C se manifiesta por transformaciones bioquímicas importantes cuantitativamente sino por modificaciones sutiles, decisivas sobre el plano organoléptico, que constituyen el afinado. Consisten esencialmente en: la densidad del producto, que refleja el agotamiento progresivo de los azúcares fermentables; la concentración en levadura, que disminuye bruscamente al final de la fermentación cuando se producen la floculación; desaparición de sustancias con aromas y sabores desagradables tales como el acetaldehído, la acetoína, el acetolactato, precursor del diacetilo; la aparición de alcoholes esterés, subproductos del metabolismo de los aminoácidos, que contribuyen positivamente al aroma y sabor de cerveza; la precipitación de las combinaciones proteínas-taninos, que confieren a la cerveza su estabilidad posterior al frío (Vogel, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 El Tejocote (*Crataegus mexicana*) y su actividad antioxidante

En la naturaleza podemos encontrar una amplia variedad de antioxidantes en diversos alimentos, por ejemplo, vegetales y frutos. Clasificados como antioxidantes del tipo orgánicos, como son; ácido ascórbico, derivados fenólicos, flavonoides, terpenoides, carotenoides. Estos son sintetizados por plantas en forma de metabolitos secundarios antioxidantes, por medio de la fotosíntesis. Que a su vez brindan protección contra enfermedades crónicas. Conocer las propiedades y contenido de las frutas, es el primer paso para su uso en condiciones nutricionales óptimas. Dentro de esa diversidad poco explorada encontramos al tejocote, fruto nativo de nuestro país (Nieto y cols., 2008).

El nombre más común con el que se les conoce a las especies del género *Crataegus mexicana* es el de “Tejocote” que se deriva del vocablo náhuatl “Texocotl” que literalmente significa fruta ácida y dura (Cabrera, 1992). Común en temporada decembrina, pero en algunas regiones del país se les encuentra todo el año, cuando madura sus tonalidades varían de un amarillo anaranjado al amarillo rojizo, aromático y de buen sabor (Higareda, 1995). Actualmente su cultivo, es considerado de importancia económica menor, se encuentra distribuido principalmente en los estados de México, Puebla, Tlaxcala, Chiapas, Michoacán, Hidalgo y Morelos. El Estado de México es uno de los tres principales productores de tejocote a nivel nacional, con una producción de 6 ton y 30 ha de producción reportadas; en este estado, existe una vasta región con zonas templadas, las cuales han sido sugeridas como reserva de amplia variabilidad genética para el género *Crataegus* (Nieto y cols., 2008) (Figura 3).



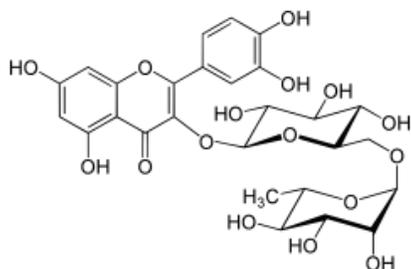
Figura 3. Fruto de tejocote (Ozcan 2005).

Fruto rico en vitamina C, carotenos y sales minerales, entre ellas el calcio, fósforo, hierro, y presenta un alto contenido de pectina (Higareda, 1995). Además del fruto, la raíz y las hojas del tejocote se han empleado tradicionalmente para aliviar diversas enfermedades humanas, entre ellas, padecimientos del corazón, del sistema respiratorio y del urinario (Nieto, 2008). Los Frutos y flores presentan constituyentes con potencialidad antioxidante, entre ellos los ácidos epicatequina y clorogénico (Ozcan , 2005).

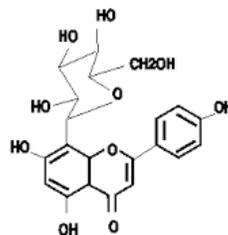
Los metabolitos secundarios antioxidantes de tejocote (*Crataegus mexicana*), son compuestos orgánicos sintetizados por este, no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, y se desarrollan mecanismos de neutralización de radicales libres. Ejemplo de metabolitos secundarios presentes en el tejocote son los flavonoides, determinantes en el fruto de tejocote, brindan color, protección a los rayos de alta energía solar y contra agentes patógenos (Buer y cols., 2010).

Existen pocos trabajos en lo referente a la composición, identificación y contenido de metabolitos secundarios antioxidantes de *Crataegus mexicana*. Sin embargo, en hojas, frutos, raíces y cortezas de otras variedades medicinales de *Crataegus* se han encontrado diversos metabolitos secundarios como, flavonoides como la Rutina (figura 4a), Vitexina (figura 4b), Ramnósido de vitexina (figura 4c), procianidinas oligoméricas de flavanoles, ácidos fenólicos, ácidos triterpénicos, ácidos orgánicos y esteroides, epicatequina (figura 4d) y catequina (figura

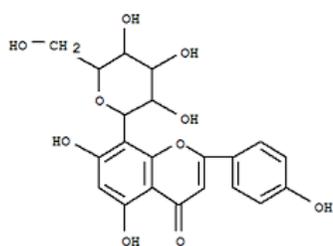
4e). También contiene una cantidad de pectinas, resinas y taninos (Argueta y cols., 1994; Özcan y cols., 2005).



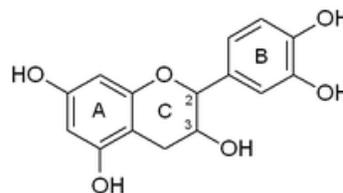
a) Rutina



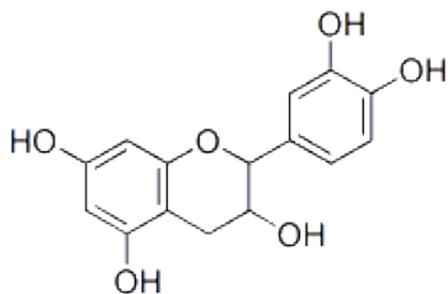
b) Vitexina



c) Ramnósido de vitexina



d) Epicatequina



e) Catequina.

Figura 4 . Contenido de metabolitos secundarios antioxidantes de *Crataegus mexicana* (Argueta y cols., 1994; Özcan y cols., 2005).

En estudios del fruto de tejocote, de variedades genéticas de Europa y Asia, se ha demostrado la presencia de terpenoides, polifenoles (catequinas–principalmente epicatequina-, proantocianidinas poliméricas y oligoméricas como la procianidina dimérica B₂, cianidina-3-O-galactósido, idaeín y ácido clorogénico), flavonoides (flavonol-O-glicosido como la quercetina-3-O-galactosido, vitexina-2''-O-ramnosido, acetilvitexin-2''-O-ramnosido, flavona-C-glicosido, e hiperósido (Froehliera y cols., 2009; Shao-Jiang y cols., 2011; Çalişkan y cols., 2012; Edwards y cols., 2012).

2.2 Datos del laboratorio de nutrición de la UAT

En el laboratorio de química de la nutrición de la UAT, se evaluó la epidermis de tejocote como fuente de antioxidantes que demuestra que la cantidad de epidermis es relativamente alta, midiendo el contenido de carotenos totales, siendo $26.4 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$, en cuanto al contenido de polifenoles se reportó $2.37 \pm 0.23 \text{ mg}$ equivalente del ácido gálico/g (Méndez y cols., 2013).

Tabla 2. Presencia de carotenos en frutos de la región de tlaxcala

Fruto	Antioxidante	Contenido en epidermis ($\mu\text{g/g}$)	Antioxidante	Contenido en epidermis (mg)
	Carotenos		Poli fenoles	
Tejocote		26.44		2.37
Durazno		15.41		0.37
Pera paraíso		6.23		0.28
Ciruela (Pronus d)		5.73		
Manzana doble rojo		2.84		1.74
Manzana California		2.04		
^a = contenido equivalente en mg de ácido gálico/g de peso				

(Méndez y cols., 2013).

El tejocote fue el fruto con mayor contenido de carotenos y polifenoles totales. De estos trabajos de investigación, se demostró la acción antioxidante del tejocote con extractos de acetona y metanol de la cascara del fruto (Méndez y cols., 2013).

Tabla 3. Determinación de la actividad antioxidante del Tejocote (*C. mexicana*) con DPPH y TBARS, IC₅₀.

Menor polaridad	Extracto de:	g obtenidos	AO/ M Trolox	AO/DPPH 100 ppm	IC ₅₀	AO/ TBARS 100 ppm	IC ₅₀
-	n-hexano	7.32	11.3	7.43		4.69	
	Diclorometano	15	12.5	18.53		11.01	
	Acetato de etilo ^a	8.5	16.6	41.46		37.21	
+	Acetona ^a	6.22	17.1	91.56	15.26	80.84	16.78
	Etanol ^b	10	17.1	75.46	54.2	68.94	54.49
	Metanol ^b	15	17.1	87.83	26.64	66.08	27.66
Mayor polaridad							
AO = Actividad antioxidante							
IC ₅₀ = Porcentaje de reducción del antioxidante							
^a = Presencia de carotenoides							
^b = Presencia de polifenoles y azúcares							

(Méndez y cols., 2013).

2.3 Bebidas alcohólicas fermentadas y su capacidad antioxidante

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como el proceso en el que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno, y la descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas para tal fin por los microorganismos (Arango, 2013). Es un proceso catabólico donde se realizan una serie de reacciones enzimáticas, hay diferentes tipos de fermentaciones y técnicas. Las más usadas son la líquida y sólida (Guillen y cols., 1998).

La presencia de actividad antioxidante en frutos y bebidas fermentadas se ha hecho evidente. Por ejemplo, los flavonoides son un grupo de productos naturales polifenólicos, se obtienen de frutas verduras, bebidas. Tales como te, bebidas fermentas como vino tinto, entre otras (Hollman y cols., 1996). Un gran porcentaje de flavonoides se obtiene de la dieta. Sus numerosos estudios epidemiológicos, sugieren la prevención de ciertas enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares asociadas a la ingesta de alimentos o bebidas ricas en polifenoles. Se ha pensado que el vino tinto tiene efectos benéficos sobre la salud

cardiovascular bien llamada “paradoja francesa”, que se define como el consumo de una dieta rica en grasas saturadas asociada a una baja incidencia de enfermedad cardiopática coronaria. La dieta mediterránea, rica en frutas y vino tinto, mostró protección frente a la aparición de eventos coronarios (Medić - Sarić y cols., 2009).

Otro ejemplo es, que una hora después de la ingesta de 300 mL de vino tinto, la capacidad antioxidante en suero aumentó en 18% comparado con la ingesta de 1 g de vitamina C. Otro efecto del consumo del vino tinto es que los polifenoles no absorbidos que permanecen en el sistema gastrointestinal, que bajo esta condición, se pueden eliminar los radicales libres y se previene la lipoperoxidación sin afectar otros antioxidantes (Dell y cols., 2005).

Guifen He y cols., (2013) determinaron que la cepa de levadura activa 3 (SIHA Active Yeast 3, *Saccharomyces cerevisiae* WET 136) de un vino de *Hawthorn* (*Crataegus pinnatifida*) influye en las características y componentes activos y que esta cepa presentó 66.46 % de actividad antioxidante por el método DPPH, 85% por anión superóxido, y por el método de barrido 4.76 mmol/L (Guifen He y cols., 2013).

Así mismo se han realizado estudios, sobre identificación de metabolitos antioxidantes presentes en bebidas fermentadas como el vino tinto. Por ejemplo, en el trabajo de Cabanis y cols., en (1998), analizaron los efectos de metabolitos antioxidantes de catequina, epicatequina, procianidina de extractos de uva, con diferente grado de polimerización, en la síntesis de triglicéridos y expresión de la hidrólisis. Utilizando cultivos de adipocitos (3T3-L1) y como grupo control; adipocitos con y sin etanol. El efecto de catequina, epicatequina y procianidina sobre los adipocitos fue estudiado mediante dos vías principales implicadas en el mantenimiento de reservas adiposas: biosíntesis e hidrólisis de los triacilgliceroles. La epicatequina no tuvo ningún efecto, ni su isómero -catequina-, pero los extractos de procianidinas redujeron la actividad de la enzima a 70% (extracto de procianidina A) y 40% (extracto de procianidina B) de los valores control. Una vez más, la procianidina extrae oligómeros más largos (extracto de procianidina B) mostrando mayor efecto. Para analizar la respuesta lipolítica además, se realizó un estudio de expresión del gen de la lipasa sensible a hormonas, que cataliza la etapa limitante de la velocidad en los adipocitos (Holm y cols.,

1997). Este estudio se llevó a cabo con procyanidina B₂, ya que tiene el mayor efecto tanto en las vías involucradas como en el almacenamiento de grasa. Por lo tanto, las procianidinas a partir de la uva y el vino tinto afectan el metabolismo de lípidos, mientras sus monómeros (catequina y epicatequina) no lo hacen (Cabanis y cols., 1998).

En otro trabajo de investigación, durante una fermentación alcohólica de *Morus nigra*, se encontró que del vino de moras se puede obtener capacidad antioxidante más alta (DPPH), debido a la producción de alcohol generado durante la fermentación, proporcionando una mejor capacidad de extracción de compuestos fenólicos (Pérez- Gregorio y cols., 2011).

Heinoen y cols., en 1998 evaluaron la actividad antioxidante de 44 vinos de frutas y bayas con contenido de compuestos fenólicos. Los frutos evaluados fueron manzanas, zarza ártica, arándanos, grosellas rojas poseían una alta actividad antioxidante, capaz de proteger los lípidos contra la oxidación también en un sistema lipídico (Heinoen y cols., 1998).

Por otra parte, Nardini en el 2006, evaluó la asociación positiva de un consumo moderado de bebidas alcohólicas con un bajo riesgo de enfermedades cardiovasculares, relacionando al etanol con su contenido en polifenoles. Observó que la cerveza fue capaz de inducir un aumento significativo ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante del plasma una hora después de consumirla, regresando a sus niveles normales basales posterior a dos horas. Todos los ácidos fenólicos medidos en plasma tendieron a aumentar después de la ingesta de cerveza, los parámetros de plasma metabólicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos y ácido úrico) y antioxidantes plasmáticos (α -tocoferol y glutatión) se mantuvieron sin cambios. Concluyendo que el etanol afecta positivamente a los antioxidantes presentes en plasma y los parámetros metabólicos medidos no son afectados (Nardini y cols., 2006).

Evidencia científica sobre la cerveza, ha acumulado estudios durante los últimos 10 años, que apuntan a que el cáncer se puede prevenir en las fases de iniciación, promoción y progresión, así como los resultados de los estudios *in vivo* sobre el metabolismo (Gerhäuse, 2005).

En estudios para la identificación por el método de cromatografía líquida con matriz de fotodiodos y detección de espectrometría de masas se aplicó a estudiar los cambios en compuestos fenólicos de 47 vinos tintos como resultado de diferentes procesos tecnológicos. Los procedimientos utilizados son: la fermentación maloláctica en barricas o en recipientes de acero inoxidable, trasiegos, clarificación, estabilización por frío y filtración. Las muestras de vino fueron tomadas antes y después de la fermentación maloláctica, a los 3 y 14 meses de envejecimiento en barricas de roble. Durante la fermentación maloláctica, se detectó la desaparición de los ésteres de ácido cafeico tartárico y ácido p-cumárico, coincidiendo con un aumento en los ácidos libres correspondientes. Se observó un cambio significativo en la concentración de la mayoría de compuestos fenólicos en el vino al final de los 14 meses de envejecimiento. Los compuestos fenólicos (flavonoides) identificados mediante retención de tiempo, espectros UV ya estandarizados por cromatografía líquida fueron, catequina (pico 8), epicatequina (pico 16) y procianidina B2 (pico 12) (Hernández y cols., 2006). Lo descrito anteriormente se muestra en la figura 5.

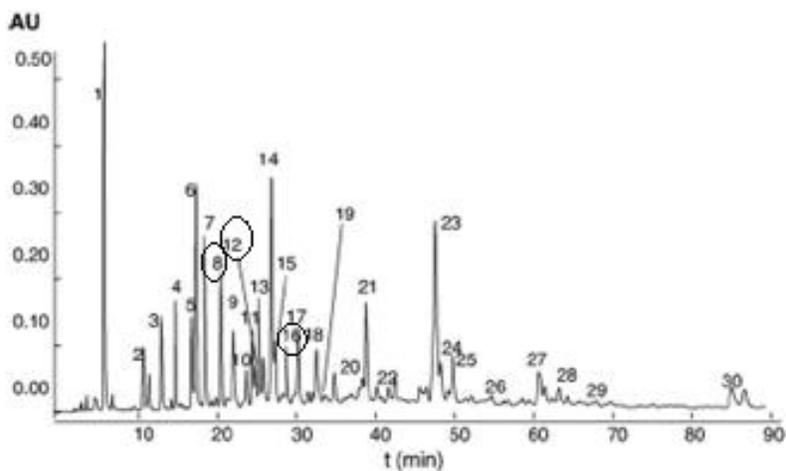


Figura 5. Perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos determinados en el vino. Los tiempos de retención e identificación de picos de los compuestos detectados en el vino, se indican en el cromatograma (Hernández, y cols., 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante determinar las propiedades antioxidantes de origen natural como es el fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) que podrían inhibir procesos oxidativos en el organismo humano.

Crataegus mexicana presenta características fenotípicas específicas, probadas en varios modelos de cuantificación de actividad antioxidante. Se espera que, sometido a un proceso biológico de fermentación, esta propiedad se conserve. Proporcionando mayor aprovechamiento en la aplicación biotecnológica del fruto, la cadena de producción se verá beneficiada en la utilización de productos industrializados en la región de Tlaxcala y sus alrededores, así como brindar beneficios extras a la salud del consumidor. Sin embargo, aún no existen reportes cuantitativos de metabolitos secundarios antioxidantes presentes en una bebida alcohólica fermentada de tejocote, por lo que servirá como aporte al conocimiento científico que es un área poco estudiada.

4. HIPÓTESIS

El fruto crudo de tejocote (*Crategus mexicana*) presentará actividad antioxidante en la fermentación alcohólica debido a que contiene metabolitos estables bajo condiciones térmicas y diversas condiciones experimentales.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante de la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*).

5.2. Objetivos específicos

1. Cuantificar la capacidad antioxidante de la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) antes y después del proceso biológico de fermentación por los métodos 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH), ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y TBARS.
2. Identificar los metabolitos antioxidantes del fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*) por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-masas).

6. METODOLOGÍA

El material y equipo a emplear fue facilitado por el laboratorio de investigación en Química de la Nutrición de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

6.1. Reactivos y solventes

6.1.1 Agentes químicos y soluciones para DPPH. 2.9 g del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH), 7 mL de etanol, solución “STOCK”.

6.1.2. Agentes químicos y soluciones para ABTS. 3.8 g de ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 1 mL de persulfato de Potasio, 5 mL de etanol.

6.1.3. Agentes químicos y soluciones para TBARS. Para el análisis de TBARS se adquirieron los siguientes reactivos de Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO): Polifenol (quercetina), sulfato ferroso (FeSO_4).

- PBS

(Buffer de fosfatos 9.5 m M, pH 7.4 y agua nano pura), KCL (cloruro de potasio), KH_2PO_4 (fosfato de potasio), NaCl (cloruro de sodio), Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico)

- EDTA (vehículo para transportar la proteína y entre a la célula).

EDTA anhidro, NaOH al 3 M, solución salina 0.9%.

- Mezcla de Lowry

NaOH 2%, hidróxido de sodio 1N, NaHCO_3 2% bicarbonato de sodio, tartrato de sodio/potasio 2%, CuSO_4 sulfato de cobre, reactivo de folin 1:1 (folin: H_2O).

- TBA 1% en NaOH 0.05N

NaOH-.5N (hidróxido de sodio), ácido tiobarbiturico 0.5%, ácido tricloroacético 30%

(Mezclar 1:1 de ácido tiobarbitúrico (0.5% disuelto en NaOH 0.5N) y ácido tricloroacético al 30%).

- FeSO₄ (inductor de estrés).

6.1.4. Agentes químicos y soluciones para HPLC- masas

6.1.4.1 Condiciones cromatográficas del laboratorio de cromatografía del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Tabla 4. Soluciones para HPLC- masas de la UNAM

Eluyente	Metanol	Agua (ac. fórmico 0.1%)
inicial	20	80
50 min	80	20
Flujo	0.3 mL/min	
Disolvente de la muestra	Metanol	

6.1.4.2. Agentes químicos y soluciones para HPLC del Laboratorio de Química de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La pureza de los disolventes y reactivos químicos fueron de grado analítico y HPLC.

Solventes

A	90.00%	Buffer
B	0 %	Metanol
C	10.00%	Acetonitrilo
D	0 %	Agua

6. 2. Recolección del fruto de tejocote (*C. mexicana*)

Los frutos fueron colectados en diciembre de 2014 y diciembre de 2015 en tres municipios (Terrenate, Tepetitla e Ixtacuixtla) en el estado Tlaxcala, México.

Por los tres municipios, se colectaron en total 20 kg de frutos. Los criterios de selección fueron el mismo tamaño, color y libre de plagas. Se utilizó pulpa y epidermis de tejocote (*Crataegus mexicana*).

6. 3. Fermentación alcohólica del fruto de tejocote (*C. mexicana*) en medio natural

Previo a la fermentación alcohólica, se trituró 1 kg de pulpa y epidermis de fruto. Posteriormente, se homogeneizó en una proporción de 1:1.5 (1 kg de fruto: 1.5 L de agua).

Para iniciar el proceso de fermentación alcohólica, se utilizó un biorreactor marca Applikon AD1 1012 con Motor Controller de 110 V. El biorreactor utilizó una velocidad de agitación de 270 rpm, 22 °C, pH 3, a dos diferentes tiempos de fermentación, la primera a 72 horas y la segunda a 120 horas.

6.4. Fermentación del fruto de tejocote (*C. mexicana*) con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial

Se trituró 1 kg de pulpa y epidermis del fruto previamente seleccionado y desinfectado

La fermentación alcohólica constó de 6 etapas:

1. Maceración por calor. Proceso de extracción sólido-líquido. Consistió en extraer del producto sólido una serie de compuestos mediante el líquido. Se utilizó 1 kilo de fruto, 4 L de agua, por un tiempo de 30 minutos a 85 °C. Posteriormente, se ajustó a 14 °Brix con azúcar de caña.
2. Pasteurización. Proceso térmico realizado al líquido con el objetivo de reducir la presencia de agentes patógenos que pueda contener el fruto. Esta “esterilización parcial” pretendió alterar lo menos posible la estructura física, química y sensorial de la bebida. La temperatura fue de 90 °C durante 50 min.

3. Adición de lúpulo. Adición del lúpulo durante la última parte de la pasteurización. Este brindó amargor, aroma y sabor a la bebida fermentada.
4. Adición de levadura. La sepa de levadura que se utilizó para iniciar el proceso de fermentación alcohólica fué *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05), tiene la capacidad de alcanzar hasta 18% Alc. Vol. La adición de la levadura fué a una temperatura de 30 °C.
5. Fermentación alcohólica del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*). El proceso biológico se desarrolló a temperatura ambiente, entre 20 y 22 °C, en plena ausencia de oxígeno y duración de 40 días.
6. Embotellado. Las botellas de cristal fueron previamente desinfectadas y esterilizadas, al día 41 se procedió a envasar.

6. 5. Neutralización de radicales libres por DPPH

Los efectos antioxidantes de tejocote (*C. mexicana*) en el radical libre, se determinó utilizando DPPH (Kim y cols., 2005). Se preparó una solución stock con 2.9 mg del radical DPPH y 7 mL de etanol. Posteriormente, se toman 3.33 mL de solución stock y se afora con etanol en un matraz de 25 mL; se llenaron todas las placas del lector de Elisa de 96 pozos con 50 µL de la muestra a evaluar y 150 µL de DPPH; se incubaron por 30 minutos a 37 °C con agitación orbital. Las lecturas se hicieron a $\lambda=517$ nm en un lector de microplacas Bio-Tek EL800.

Fórmula de % de reducción de DPPH= $[(C-E) / C] \times 100$ donde:

C= absorbancia del control

E= Absorbancia de la muestra a evaluar.

6. 6. Neutralización del radical ABTS

Para determinar la capacidad secuestrante del fermentado se siguió el procedimiento descrito por Kuskoski 2005, que consistió en producir el radical ABTS mediante la solución de ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, sal diamónica) 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM (concentración final). Se mezcló y se incubó en la oscuridad de 12-16 h a 25 °C. Una vez formado el radical se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia

de 0.70 a 436 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 UV (Electron corporation). Se tomaron 10 µL de la muestra y se adicionó 990 µL de la solución del ABTS⁺. Se monitoreó el efecto secuestrante cada minuto durante 6 minutos. Para determinar el porcentaje de reducción se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción del radical ABTS} = (\text{Abs} - \text{Abs por min}) / \text{Abs inicial} * 100$$

La capacidad secuestrante de la muestra se comparó con la del trolox expresados como mg equivalentes de trolox por gramo de muestra.

$$\text{TEAC} = \% \text{ de reducción} - 3.09777 / 4.76498$$

6. 7. Determinación de la inhibición de la lipoperoxidación con la técnica de TBARS

La actividad antioxidante del fermentado de tejocote fue evaluada por cuantificación de la eficiencia para inhibir la lipoperoxidación inducida por Fe²⁺ en homogenizado de cerebro de rata. El homogenizado de cerebro de rata fue preparado de ratas macho adultas Winstar con un peso entre 200 a 250 g. El tejido del cerebro fue rápidamente disectado y los residuos de sangre se retiraron usando una solución salina 0.15 M, se obtuvo el homogenizado con un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio usando 10 mL de buffer de fosfato salino (PBS) 0.1 M (0.2 g de KCl, 0.2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl, y 2.16 g de NaHPO₄.7 H₂O) /L), a pH 7.4 y temperatura de 5 °C por gramo de cerebro (Dominguez y cols., 2005).

Preparación de la muestra

- 1) Se pesó 15 mg de muestra en un tubo eppendorf, el peso de la muestra se multiplicó por 20, dando lugar a los µL de etanol que se disolvió.
- 2) Se formó una solución stock de la muestra.
- 3) Se tomaron 240 mL de solución stock muestra más 60 µL de etanol.

Disección y homogenizado del cerebro

- 1) Sacrificar a la rata

- 2) Extraer el cerebro completo y colocarlo en solución salina 0.9% fría (agua nanopura y cloruro de sodio)
- 3) Se lavó el cerebro en agua destilada para retirar restos de sangre.
- 4) Se pesó el cerebro y agregó 5 mL de PBS por cada gramo de cerebro.
- 5) Se homogenizó por 60 segundos con un homogeneizador mecánico con punta de teflón.
- 6) Se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm hasta recuperar el sobrenadante.
- 7) Se pasó a cuatro tubos de plástico de 10 mL (todas al mismo volumen).

* El sobrenadante (proteínas y lípidos) que se recuperó se mide con una probeta.

- **Cuenta de proteínas y lípidos**

Posteriormente, se realizó la cuenta y ajuste de proteínas y lípidos. El homogenizado se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se determinó el contenido de proteína por el método descrito por Lowry et al. (1951), ajustando a 2.66 mg de proteína/mL con buffer de fosfato (PBS) usando albumina bovina como estándar. A continuación de describen casa uno de los pasos realizados:

Preparación de la solución Lowry

En un matríz de 50 mL se agregó

1. 24.5 mL de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N
2. 0.25 mL tartrato Na/K 2 %
3. 0.25 sulfato de cobre CuSO_4 1%

Cuenta de proteínas

1. Se realizó con el lector de Elisa
2. Se tomó por triplicado 5 mL de homogeneizado de cerebro y se colocó en cada pozo de la placa (limpia).

3. Se agregó 20 µL de agua destilada más solución de Lowry e incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
4. Se agregó 25 µl de reactivo Folin, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Se midió absorbancia a 540 nm

* La proteína debe estar arriba de 2.6 mg/mL

Ajuste de proteínas

-Después de aplicar la solución de Folin incubar 30 minutos

-Se colocó en un pozo de la placa 200 µL de PBS (blanco)

Fórmula:

Proteína (µg/ml) = (A540 nm- 0.05012) / (0.0028) * 40.

Por ejemplo: (.2515 – 0.0512) / (0.0028) * 40 = 2876.857 / 1000 = 2. 87 mg/mL.

Para ajustar la proteína a 2.666 mg/mL con PBS (9.5 mM, pH 7.4)

Aplicar: $V_2 = C_1 V_1 / C_2$

((Proteína mg/ml) (2.876) * (volumen de sobrenadante obtenido) (28.5)) / 2.666 = 30.68 –
volumen de sobrenadante obtenido = 2.18 mL de PBS que deben agregar al sobrenadante.

- **Llenado de tubos**

A continuación el supernadante (375 µL, 1 mg de proteína) se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de EDTA 10 µM y fue preincubada a 37 °C por 30 minutos con la muestra 50 µL a concentraciones de 3-50 mg/L bajo agitación, la peroxidación fue iniciada con la adición de 50 µL de FeSO₄ recién preparado (concentración final 10 µM) (Ng y cols., 2000) se continuo la incubación por una hora más. Después los tubos se sumergieron en baño de hielo y se adicionó 0.5 mL del reactivo TBA de ICN Biomedicals, INC, Ohio (1% de ácido tiobarbiturico en 0.05 N de NaOH y 30% de ácido tricloroacetico 1:1) luego se centrifugo a 3000 g (12000 rpm) por 10 minutos. El llenado se describe a continuación.

Se llenan por triplicado

Volumen	Blanco	Basal	FeSO ₄	FeSO ₄ + Vehículo	Muestra
375 µL	PBS	Sobrenadante	Sobrenadante	Sobrenadante	Sobrenadante
50 µL	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA 10 µl	EDTA
25 µL	*Vehículo	PBS	PBS	Vehículo	Muestra extracto

Preparación de sulfato ferroso

- Se pesó 6.95 mg y aforó a 25 mL con agua nanopura
- Tomar 1 mL + 9 mL de agua nanopura

*incubar 30 minutos a 37 °C con agitación.

50 µL	FeSO ₄	Agua nanopura	FeSO ₄	FeSO ₄	FeSO ₄
-------	-------------------	---------------	-------------------	-------------------	-------------------

* Se prepara al momento el FeSO₄, se incubó 1 hora a 37 °C con agitación.

500 µL	TBA	TBA	TBA	TBA	TBA
--------	-----	-----	-----	-----	-----

*Incubar 10 minutos con baño de hielo.

*Baño maría 90 °C por 30 minutos.

- **TBA**

Finalmente para la valoración del alcance de la liperoxidación de lipidos fue determinada por la muestra en función de la producción de MDA del supernadante por el desarrollo del ensayo de TBARS descrito por (Kibanova y cols., 2009). El MDA es un producto final de la descomposición de ácidos grasos insaturados del proceso de peroxidación lipídica y su acumulación de este en el tejido es indicativo del nivel de peroxidación lipídica. Esta mezcla fue calentada a 94 °C por 30 minutos. Después se enfrió en baño de hielo; se tomaron 200 µL de supernadante y la densidad óptica fue determinada a $\lambda=540$ nm en un lector de microplacas Bio-Tek EL800. Los blancos para cada muestra fueron preparados y valorados en la misma forma para excluir alguna contribución externa.

1. NaOH 0.05 µL de hidróxido de sodio (se pesó 50 mg y aforó a 25 mL con agua nanopura)

2. Ácido tiobarbitúrico 0.05 % (se pesó 125 mg y aforó a 25 mL de NaOH 0.05 m)
3. Ácido tricloroacético 50 % (se pesó 30 g y aforó en 100 mL de agua nanopura)
4. Se mezcló 1:1 de ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético.
5. En un matríz de 50 mL se colocaron 25 mL de ácido tiobarbitúrico y 25 de tricloroacético.
6. Se dejó a baño maría por 30 minutos.
7. Se enfrió por 10 minutos.
8. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos
9. Se añadió a la placa 200 µL y se realizó la lectura

El resultado de TBARS se expresó como equivalentes de MDA usando el estándar 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Esterbauer y Cheeseman, 1990). El % de inhibición se define como el decremento de la formación de TBARS debido a la quelación de la muestra y fue calculada como sigue:

% de inhibición = [(C-E)/C] X 100 donde:

C= absorbancia del control

E= Absorbancia de la muestra a evaluar.

6.8 Identificación de metabolitos bioactivos presentes en el fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*)

6.8.1 Cuantificación de metabolitos por HPLC- masas del Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

La identificación de los metabolitos bioactivos antioxidantes de la bebida fermentada de tejocote (*C. mexicana*), es la última etapa del proyecto.

La muestra con la bebida de *C. mexicana* se envasó al vacío, en un frasco previamente desinfectado y esterilizado con un volumen de 330 mL. Se llevó al laboratorio de Cromatografía en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 con espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000, nebulizador con 50 psi, Gas de secado de 3 L/min, temperatura de secado de

350 °C y temperatura de presión de 400 °C, UV 287, longitud de onda de los cromatogramas de 254 nm, columna kinetex C8 2.6 um, eluyentes empleados son metanol y agua (ácido fórmico al 0.1 %), flujo de 0.03 mL/min y la muestra fue disuelta en metanol (figura 6).

 Laboratorio de Cromatografía Condiciones Cromatográficas	
Muestra:	Cer
Cromatógrafo de Líquidos	Agilent 1200
Detector	Espectrómetro de Masas Bruker Esquire 6000 APCI Nebulizador 50 psi Gas de secado 3 L/min Temperatura de secado 350°C Temperatura de vaporización 400°C Scan 100-1200 m/z Target 426 m/z
	Waters UV 2487 Longitud de onda de los cromatogramas 254 nm
Columna	Kinetex C8 2.6 um 50x2.1 mm 100A
Eluyente	Metanol Agua (ac. fórmico 0.1%)
	inicial 20 80
	50 min 80 20
Flujo	0.3 mL/min
Disolvente de la muestra	Metanol
Fecha	03-12-2015

Figura 6. Condiciones cromatográficas para el fermentado de *Crataegus mexicana* del Instituto de Química de la UNAM.

6.8.2 Cuantificación de metabolitos por HPLC en el Laboratorio de Química de los Alimentos de la Licenciatura de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala

La muestra con la bebida fermentada de *C. mexicana* envasada al vacío mantuvo las mismas condiciones mencionadas para la inyección del HPLC-masas de la UNAM.

Las determinaciones en cromatografía se realizaron en un equipo AGILENT serie 1200, bajo las siguientes condiciones: flujo 1.000 mL/min, longitud de onda de 210, 254 y 280 nm, tiempo de detención 45 min a temperatura ambiente, presión 90-100 bar, columna de fase inversa C₁₈ (4.6 x 250 mm) marca zorbax, fase móvil fue de 90 % buffer de ácido fosfórico pH 2.5 y 10 % acetonitrilo.

7. RESULTADOS

7.1. Recolección del fruto

Se colectaron en total 20 kilos de fruto de tejocote (*C. mexicana*). De estos, solo se emplearon 15 kilos aproximadamente. El fruto de *C. mexicana* estaba maduro, libre de plagas y sin magullar (Figura 7).



Figura 7. Fruto maduro de tejocote libre de plagas

Posteriormente, se desinfectó y retiró el hueso. Para la elaboración de la bebida solo se empleó pulpa y epidermis de *C. mexicana* (figura 8).



Figura 8. Obtención de pulpa y epidermis de tejocote.

7.2. Fermentación del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) en medio natural y evaluación de actividad antioxidante.

7.2.1. Fermentación alcohólica 72 horas y evaluación de actividad antioxidante

La fermentación en medio natural en un tiempo de 72 horas y sin ajustar los ° Brix. Mostraron que la levadura nativa de *C. mexicana* fue incapaz de degradar la fuente de azúcares. Por lo tanto, no hay producción de CO₂ y etanol. A las 72 horas, los °Brix se mantienen en un mismo porcentaje, evidenciándose la usencia dé % Alc. Vol (figura 10a).



Figura 9. Biorreactor Applikon AD1 1012 con Motor Controller, Fermentación medio natural por 72 horas.

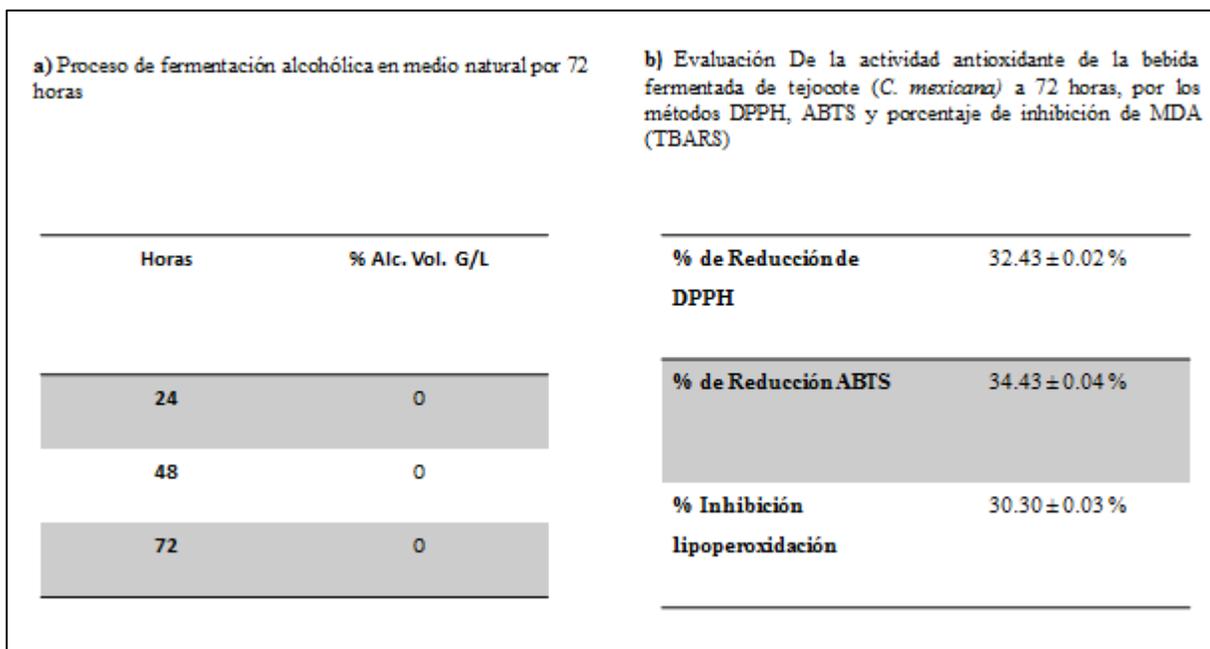


Figura 10. Evaluación de fermentación de la bebida alcohólica de Tejuocote (*Crataegus mexicana*) en medio natural a 72 horas.

Al finalizar el proceso biológico de fermentación alcohólica de tejuocote (*C. mexicana*), se evaluó la actividad antioxidante. Los resultados del método DPPH muestran un 32.43 ± 0.02 % de reducción del radical, mientras que el método ABTS un 34.43 ± 0.04 % de reducción del radical libre y finalmente un 30.30 ± 0.03 % de inhibición de lipoperoxidación (TBARS) en cerebro de rata (figura 10b).

Los resultados se muestran positivos, la actividad antioxidante se mantuvo a pesar a un proceso de oxidación, aireación y agitación en el biorreactor durante 72 horas.

7.2.2. Fermentación alcohólica 120 horas y evaluación de actividad antioxidante

Los resultados de la fermentación alcohólica en el Biorreactor Applikon AD1 1012 medio natural por 120 horas son los siguientes: la fermentación alcohólica al día 0, mostró la concentración de sacarosa de la solución en 0.73 °Brix y 0 % Alc. Vol., a las 48 horas la concentración de sacarosa en la solución mostró 0.73 ° Brix y 0 % Vol. Alc., a las 120 horas $.73$ °Brix y 0 % Alc. Vol. (figura 11a).

a) Proceso de fermentación alcohólica en el Biorreactor Applikon AD1 1012 medio natural por 120 horas		b) Evaluación De la actividad antioxidante de la bebida fermentada de tejocote (<i>C. mexicana</i>) a 120 horas, por los métodos DPPH, ABTS y porcentaje de inhibición de MDA (TBARS).	
Horas	° Alcohol (% Vol.) ° G/L	% de reducción de DPPH	34.43 ± .04
0	0	% de reducción ABTS	35.45 % ± .02
48	0	%Inhibición lipoperoxidación.	32.20 % ± .04
120	0		

Figura 11. Evaluación de fermentación de la bebida alcohólica de Tejocote (*Crataegus mexicana*) en medio natural a 120 horas.

Posteriormente, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante en el fermentado de *Crataegus mexicana* en medio natural. Los resultados de la fermentación en medio natural, son los siguientes, porcentaje de reducción del radical DPPH fue 43.43 ± 0.04 %, porcentaje de reducción de radical ABTS fue 35.45 ± 0.02 %, porcentaje de inhibición de lipoperoxidación 32.20 ± 0.04 %. Lo descrito anteriormente se muestra en la tabla 8 (figura 11 b).

La siguiente imagen (figura 12), muestra la capacidad de neutralización que tuvo el fruto de *C. mexicana* sometido a un proceso de fermentación en medio natural ante el radical libre DPPH. El método se realizó por triplicado.

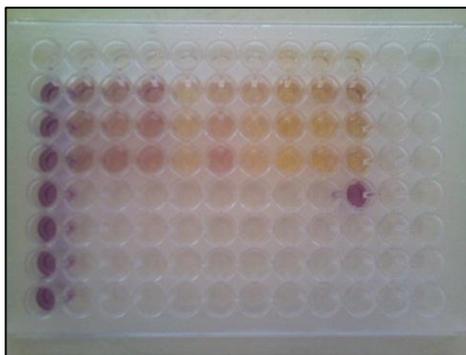


Figura 12. Capacidad de neutralización del fermentado de *C. mexicana* en medio natural, ante el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

7.2.3. Fermentación alcohólica de cerveza artesanal en un medio artificial con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05)

Para la elaboración de la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) en medio artificial, se colaboró con el Dr. Hugo Castorena García, docente e investigador del Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Elaboré cerveza artesanal, con la finalidad de dominar el procesamiento de bebidas alcohólicas fermentadas”. En una estancia de 2 meses y medio. Y así mejorar las propiedades sensoriales de la bebida alcohólica de *Crataegus mexicana*.

El procesamiento de la cerveza artesanal es el siguiente.

1. Maceración por calor. Proceso de extracción sólido-líquido. Consistió en extraer del producto sólido una serie de compuestos mediante el líquido; 2. Pasteurización. Proceso térmico realizado al líquido con el objetivo de reducir la presencia de agentes patógenos que pueda contener el cereal; 3. Adición de lúpulo. Este brindó amargor, aroma y sabor a la cerveza; 4. Adición de levadura. La sepa de levadura que se utilizó para iniciar el proceso de fermentación alcohólica fué *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05), tiene la capacidad de alcanzar hasta 18 % Alc. Vol. La adición de la levadura fue a una temperatura de 30 °C; 5. Fermentación alcohólica. Duración de 40 días. Como resultado,

se obtuvo una cerveza artesanal parda tipo Munich, con 7 ° Alc. Vol., con sabor ligeramente dulce debido al caramelizado de la malta (Imagen 7).



Figura 13. Cerveza parda artesanal tipo Munich.

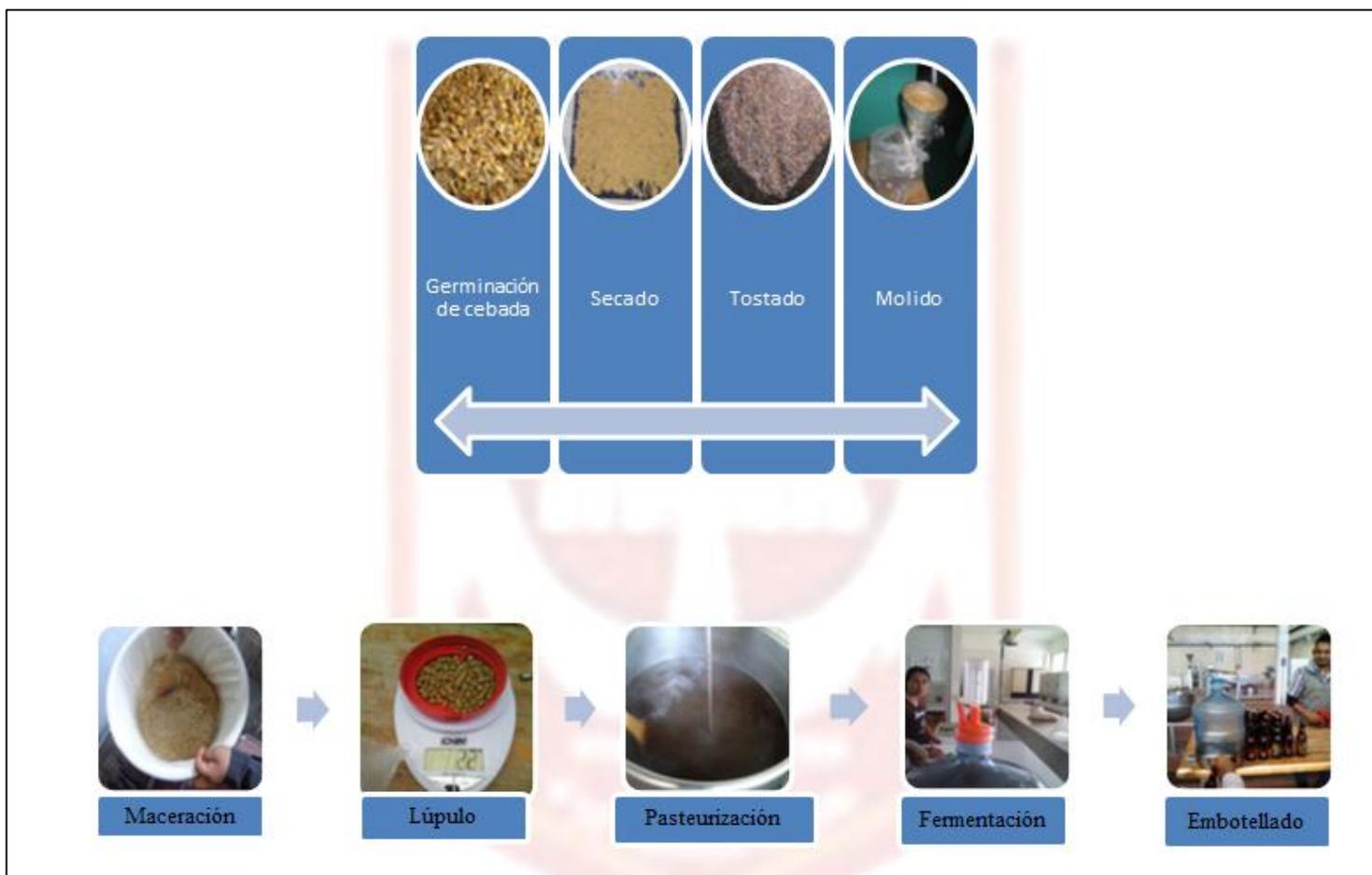


Figura 14. Proceso de elaboración de cerveza artesanal tipo Munich con un toque de sabor ligeramente dulce.

7.3 Fermentación del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial.

Los resultados de la bebida alcohólica fermentada de tejocote (*C.mexicana*) en medio artificial con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) son los siguientes: el día 0 se ajustó a 14 °Brix con 0% Vol. Alc., al día 20 el porcentaje de sacarosa baja a 7 ± 0.05 °Brix y el % de etanol aumenta a 10 ± 0.04 % vol. Alc., al término de la fermentación al día 40 se obtuvieron 6 ± 0.05 °Brix y 12 ± 0.05 % Vol. Alc.

Tabla 7. Proceso de fermentación alcohólica con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial.

Días	° Brix	% Alc. Vol.
0	14	0
20	7 ± 0.05	10 ± 0.04
40	6 ± 0.05	12 ± 0.05

Resultó favorable añadir la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) seca tipo Ale US 05, ya que la bebida alcohólica presentó 12 % Alc. Vol. Es el mejor resultado, en términos de calidad organoléptica (aroma, sabor y color) en comparación a la fermentación alcohólica en un medio natural.



Figura 15. Bebida alcohólica fermentada de tejocote (*C. mexicana*) en medio artificial con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) seca tipo Ale US 05.

7.4 Evaluación de la actividad antioxidante en medio artificial.

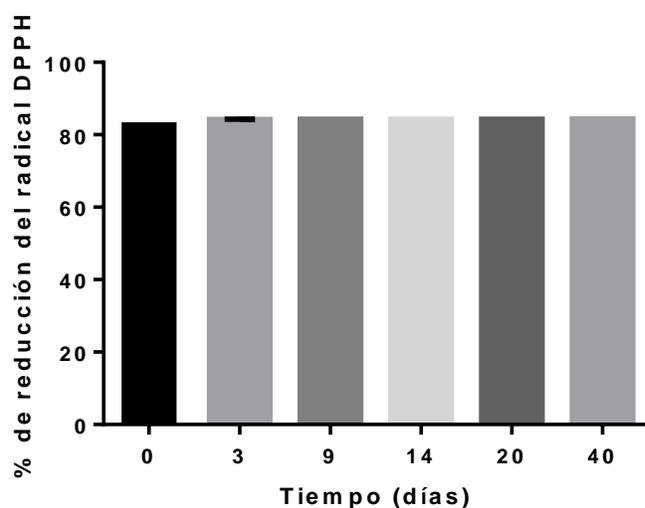
7.4.1 Neutralización de radicales libres por DPPH

La evaluación de la actividad antioxidante utilizó un análisis estadístico de una sola vía con medidas repetidas del programa GraphPad Prism. La propiedad se evaluó por el método DPPH, donde se observa que fue posible conservar esta propiedad, una vez sometido al proceso biológico de fermentación.

Los resultados son; el día 0, presentó una media de 84.23 ± 0.04 ; el día 3, una media de 84.25 ± 0.003 ; el día 9, una media de 84.28 ± 0.001 ; día 14, una media de 84.31 ± 0.004 ; el día 20, una media de 84.33 ± 0.003 y finalmente el día 40, una media de 84.34 ± 0.001 % de reducción del radical DPPH (figura 16 a).

a) Porcentaje de neutralización del radical DPPH

Días	% de neutralización del radical DPPH
0	84.23 ± 0.04
3	84.25 ± 0.003
9	84.28 ± 0.001
14	84.31 ± 0.004
20	84.33 ± 0.003
40	84.34 ± 0.001



b) Evaluación de la actividad antioxidante del fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*) por el método DPPH.

Comparación múltiple Bonferroni's	Significativo
0 vs 3	No
0 vs 9	No
0 vs 14	Si
0 vs 20	Si
0 vs 40	Si

c) Comparación múltiple de Bonferroni's del fermentado de fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial por el método DPPH.

Figura 16. Evaluación de capacidad antioxidante por DPPH en medio artificial.

Se encuentra diferencia significativa entre el día 0 y el 40 ya que ($p < 0.05$). $P = 0.007$ (figura 16b).

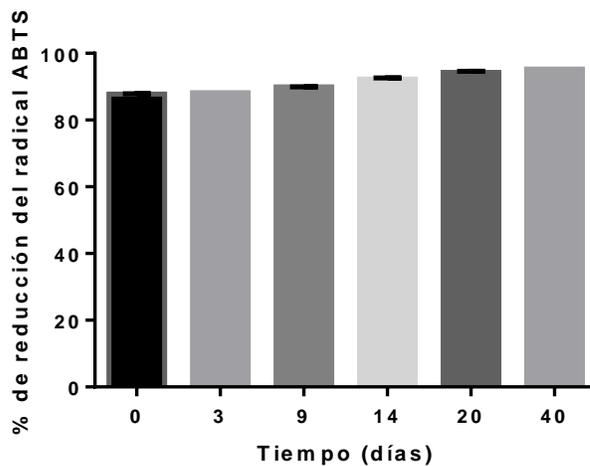
Los resultados obtenidos por la técnica Bonferroni's son; día 0 contra el 3 no hay diferencia significativa, día 0 contra 9 no hay diferencias significativa. Mientras que, los días 0 contra 9, 0 contra 14, 0 contra 20 y 0 contra 40, si presentan diferencia significativa en % de reducción del radical DPPH (figura 16c).

7.4.2 Evaluación de la actividad antioxidante del fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*) neutralizando al radical ABTS

Los resultados de la técnica ABTS son; el día 0, presentó una media de 87.83 ± 0.003 ; el día 3 presentó una media de 88.19 ± 0.006 ; el día 9 presentó una media de 84.94 ± 0.028 ; el día 14 presentó una media de $92.3 \pm .030$; el día 20 presentó una media de 94.33 ± 0.33 y finalmente el día 40 presentó una media de 95.32 ± 0.02 % de reducción del radical ABTS (figura 17a).

a) Porcentaje de reducción del radical ABTS

Días	% de Reducción del radical ABTS
0	87.83 ± 0.003
3	88.19 ± 0.006
9	84.94 ± 0.028
14	92.3 ± .030
20	94.33 ± 0.33
40	95.32 32 ± 0.02



b) Evaluación de la actividad antioxidante del fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*) por el método ABTS en medio artificial.

Comparación múltiple Bonferroni's	Significativo
0 vs 3	Si
0 vs 9	Si
0 vs 14	Si
0 vs 20	Si
0 vs 40	Si

b) Comparación múltiple de Bonferroni's del fermentado de fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial por el método ABTS.

Figura 17. Evaluación de la actividad antioxidante por ABTS

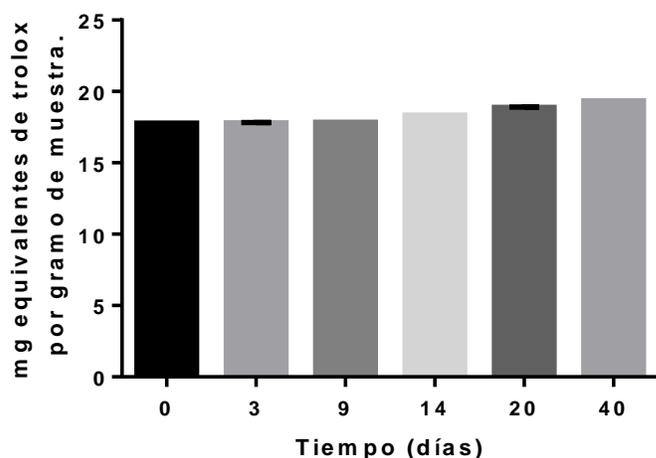
Se encuentra diferencia significativa entre el día 0 y el 40 ya que ($p < 0.05$). $P = 0.0027$ (figura 17b).

Los resultados obtenidos por la técnica de Bonferroni's son; día 0 contra los días 3, 9, 14, 20 y 40. Presentan una diferencia significativa entre cada una de ellas (figura 17c).

La capacidad secuestrante del fermentado, se comparó con trolox, expresados como mg equivalente de trolox por gramo de muestra. Los resultados se describen a continuación; el día 0, presentó una media de 17.78 ± 0.004 ; el día 3 presentó una media de 17.81 ± 0.005 , el día 9 presentó una media de 17.85 ± 0.003 , el día 14 presentó una media de 18.34 ± 0.002 , el día 20 presentó una media de 18.89 ± 0.003 y finalmente el día 40 presentó una media de 19.35 ± 0.002 mg equivalentes de trolox por gramo de muestra (figura 18a). Se encuentra diferencia significativa entre el día 0 y el 40 ya que ($p < 0.05$). $P = < 0.001$ (figura 18b).

a) mg equivalentes de trolox por gramos de muestra en medio artificial.

Días	mg equivalentes de trolox por gramos de muestra
0	17.78 ± 0.004
3	17.81 ± 0.005
9	17.85 ± 0.003
14	18.34 ± 0.002
20	18.89 ± 0.003
40	19.35 ± 0.002



c) Actividad secuestrante comparada con trolox. Donde se emplea Anova de una vía de medidas repetidas, donde $P = < 0.001$.

Figura 18. Capacidad secuestrante comparado con Trolox.

7.4.3 Determinación de la inhibición de la lipoperoxidación con la técnica de TBARS

Se realizó la estimación del MDA (producto final de la lipoperoxidación), utilizando FeSO_4 como inductor del estrés oxidante; este compuesto genera radicales libres derivados de oxígeno los cuales son muy inestables. Se observó, una alta protección ante la lipoperoxidación, por parte de la fuente de antioxidantes (fermentado de *Crataegus mexicana*) ya que se inhibió la producción de MDA.

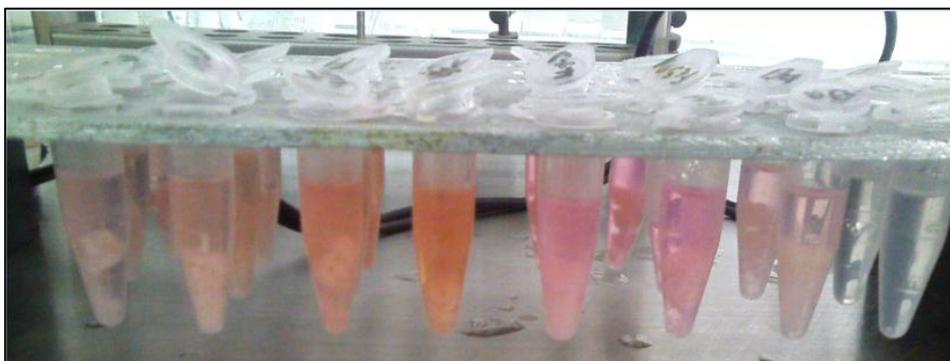
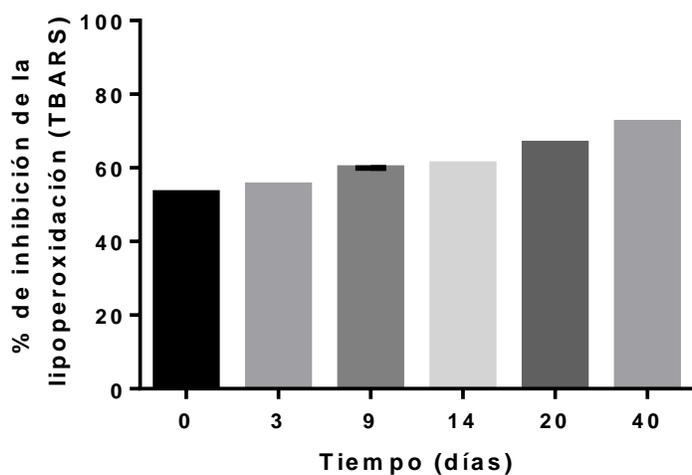


Figura 19. Determinación de la lipoperoxidación y efectividad de fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*) como antioxidante con la técnica TBARS

Los resultados son; el día 0, presentó una media de 53.23 ± 0.028 , el día 3 presentó una media de 55.33 ± 0.004 , el día 9 presentó una media de 59.94 ± 0.029 , el día 14 presentó una media de 61.01 ± 0.003 , el día 20 presentó una media de 66.63 ± 0.01 y finalmente el día 40 una media de 72.26 ± 0.004 % de inhibición de la lipoperoxidación (TBARS) (figura 20a).

a) Evaluación del porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación por la técnica TBARS

Días	% de inhibición de lipoperoxidación (TBARS)
0	87.83 ± 0.003
3	88.19 ± 0.006
9	84.94 ± 0.028
14	92.3 ± .030
20	94.33 ± 0.33
40	95.32 32 ± 0.02



b) % de inhibición de la lipoperoxidación, emplea do Anova de una vía de medidas repetidas, donde $P = < 0.001$.

Comparación múltiple Bonferroni´s	Significativo
0 vs 3	Si
0 vs 9	Si
0 vs 14	Si
0 vs 20	Si
0 vs 40	Si

c) Comparación múltiple de Bonferroni´s del fermentado de fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dry Ale Yeast US 05) en medio artificial por el método TBARS.

Figura 20. Evaluación de la actividad antioxidante por TBARS en medio artificial

Se encuentra diferencia significativa entre el día 0 y el 40 ya que ($p < 0.05$). $P = 0.001$ (figura 20b).

Los resultados estadísticos obtenidos por comparación múltiple de Bonferroni's, se presentan a continuación. Se observa una diferencia significativa, al comparar el día 0 contra los días 3, 9, 14, 20 y 40 en el % de inhibición de la lipoperoxidación (TBARS) (figura 20c).

7.5 Identificación de metabolitos bioactivos presentes en el fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*)

7.5.1 Cuantificación de metabolitos por HPLC- masas del Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

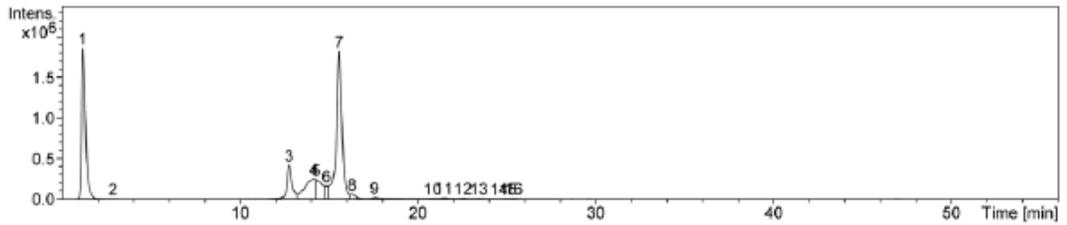
Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas, con tiempo de fermentación de 40 días y 12 % Vol. Alc. Los resultados se muestran en la siguiente cromatograma. Se observó la presencia de metabolitos, en la bebida fermentada de tejocote (*C. mexicana*) siendo los picos más pronunciado el 1, 3 y 7.

Como resultado del bombardeo de electrones por el HPLC. Se observó que los picos más pronunciados son: pico 1, con tiempo de retención de 1.1 minutos, fracción de área de 28.6%; pico 3, con tiempo de retención de 12.7 minutos y una fracción de área de 8.9%; por último pico 7, con tiempo de retención de 15.6 minutos y fracción de área de 41.7% (figura 21).

Compound Mass Spectrum List Report

Analysis Info		Acquisition Date	03/12/2015 03:31:09 p.m.
Analysis Name	D:\Data\ext\text00431.d	Operator	Carmen Marquez
Method	Sria tecnica.m	Instrument	esquire8000
Sample Name	Cer		
Comment			

Acquisition Parameter					
Ion Source Type	APCI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-111.3 Volt	Skim 1	-40.0 Volt	Trap Drive	41.8
Accumulation Time	250000 µs	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	1.1	27823317	28.6
2	2.8	9127	0.0
3	12.7	8851051	8.9
4	14.1	10098851	10.4
5	14.3	8224148	6.4
6	14.8	1889468	1.9
7	15.6	40566521	41.7
8	16.3	1074347	1.1
9	17.5	248935	0.3
10	20.8	48793	0.1
11	21.5	203159	0.2
12	22.5	82504	0.1
13	23.4	23946	0.0
14	24.6	32572	0.0
15	25.1	93272	0.1
16	25.4	138418	0.1

Figura 21. Cromatograma del fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*) realizado por el laboratorio de cromatografía del Instituto de Química de la UNAM.

A continuación se muestran los resultados de espectrometría de masas, para la caracterización de los metabolitos antioxidantes.

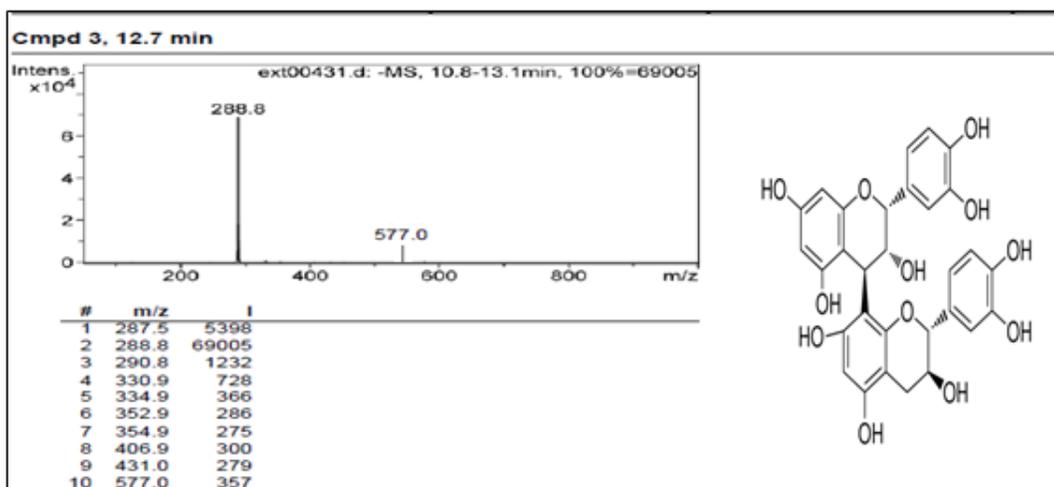


Figura 22. Espectrometría de masas del fermentado de tejocote (*Crataegus mexicana*). Pico 3. Comparada con estructura química Procyanidina B2. p.m= 577 g/mol.

El pico o compuesto 3, presenta relación masa carga de 577 m/z con un pico base de 288.9 m/z, los cuales concuerdan con la estructura molecular de Procianidina B2. Estos resultados, se comparan con estudios de compilación de LC/UV y bibliotecas MS/MS utilizando 39 estándares fenólicos y así aplicarlos para investigar los metabolitos presentes en diferentes muestras fermentadas (figura 22).

7.5.2 Cuantificación de metabolitos por HPLC de la muestra del fermentado de tejocote en medio artificial, en el Laboratorio de Química de los Alimentos de la Licenciatura de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala

Se inició inyectando la muestra sin diluir del fermentado de tejocote (*C. mexicana*) en tres diferentes longitudes de onda; 254, 210 y 280 nm. Para la técnica se utilizó una fase móvil de 90 % buffer y 10 % acetonitrilo. El tiempo de retención fue de 45 min a temperatura ambiente y las inyecciones de la muestra fueron de 10 µL. se realizaron inyecciones por triplicado.

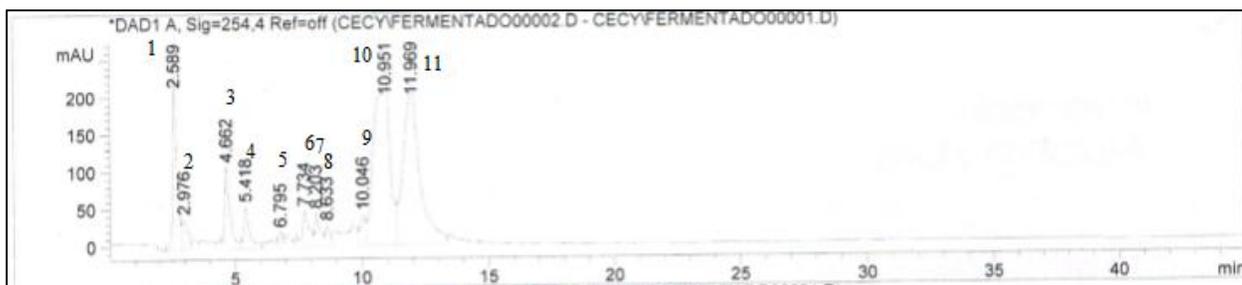
Como primer resultado, se muestra el cromatograma a 254 nm, de la muestra sin diluir del fermentado de tejocote (*C. mexicana*) en medio artificial. Tiene un total de 11 picos. El pico 1, se registró al minuto 2.58 con área de 9.63 %; el pico 2, se registró al minuto 2.97 con área de

2.36 %; el pico 3, se registró al minuto 4.66 con área de 5.82 %; el pico 4, se registró al minuto 5.41 con área de 3.26 %; el pico 5, se registró al minuto 6.79 con área de 0.86 %; el pico 6, se registró al minuto 7.73 con área de 3.22 %; el pico 7, se registró al minuto 8.20 con área de 2.13 %; el pico 8, se registró al minuto 8.63 con área de 1.26 %; el pico 9, se registró al minuto 10.04 con área de 1.97; el pico 10, se registró al minuto 10.95 con área de 35 % y finalmente el pico 11, se registró al minuto 11.96 con área de 33.99 (figura 23a).

El segundo resultado, del cromatograma a 210 nm, con la muestra del fermentado de tejocote en medio artificial, tiene un total de 12 picos. Pico 1, se registró al minuto 2.58 con área de 8.35 %; el pico 2, se registró al minuto 3.01 con área de 2.53 %; el pico 3, se registró al minuto 4.22 con área de 3.21 %, el pico 4, se registró al minuto 6.36 con área de 7.73 %; el pico 5, se registró al minuto 6.92 con área de 1.85 %; el pico 6, se registró al minuto 7.73 con área de 19.33 %; el pico 7, se registró al minuto 8.20 con área de 20.41; el pico 8, se registró al minuto 8.63 con área de 6.98 %; el pico 9, se registró al minuto 8.89 con área de 4.23 %; el pico 10, se registró al minuto 9.94 con área de 5.89 %; el pico 11, se registró al minuto 10.93 con área de 14.08 % y finalmente el pico 12, se registró al minuto 11.94 con área de 11.54 % (figura 23b).

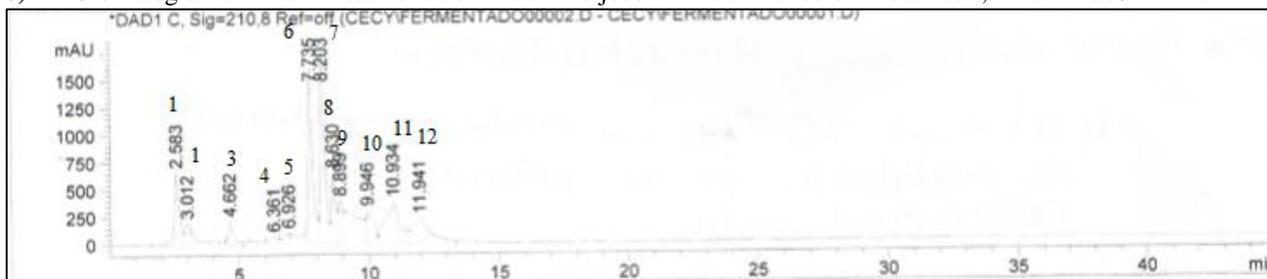
Finalmente, los resultados del cromatograma a 280 nm, registró un total de 11 picos. El pico 1, se registró al minuto 2.58 con área de 4.70 %; el pico 2, se registró al minuto 2.99 con área de 2.19%; el pico 3, se registró al minuto 3.67 con área de 3.78 %; el pico 4, se registró al minuto 4.66 con área de 15.46 %; el pico 5, se registró al minuto 5.41 con área de 3.47 %; el pico 6, se registró al minuto 6.79 con área de 2.42 %; el pico 7, se registró al minuto 7.73 con área de 12.54 %; el pico 8, se registró al minuto 8.18 con área de 9.77 %; el pico 9, se registró al minuto 8.88 con área de 3.71 %; el pico 10, se registró al minuto 9.180 con área de 4.96 % y finalmente el pico 11, se registró al minuto 11.78 con área de 0.81 % (figura 23c).

a) Cromatograma de fermentado de tejocote en medio artificial a 254 nm.



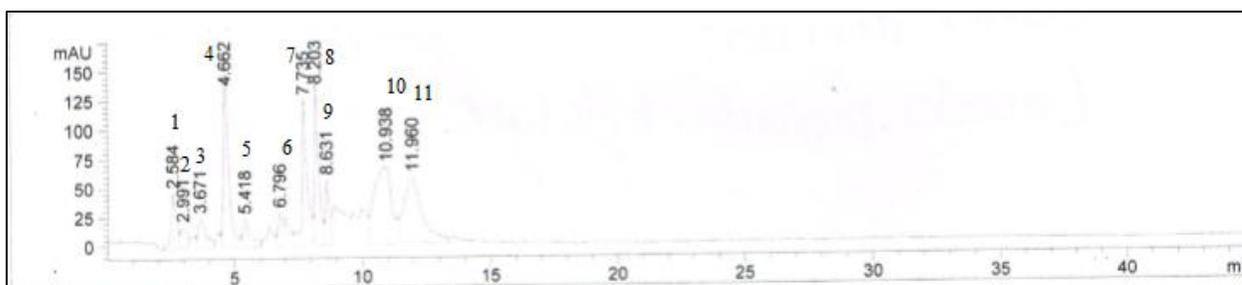
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2015-2016.

b) Cromatograma de fermentado de tejocote en medio artificial, a 210 nm.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2015-2016.

c) Cromatograma de fermentado de tejocote en medio artificial, a 280 nm



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2015-2016.

Figura 23. HPLC del laboratorio de Química de la Nutrición de la UAT.

De acuerdo con los resultados anteriores, la muestra del fermentado de tejocote, presentó concordancia en tiempos de retención, aun sometidos a tres diferentes longitudes de onda (254, 210 y 280 nm). Los tiempos de retención que coincidieron son; 2.58, 4.62, 7.73, 8.203, 8.63, 11.9. Sin embargo no tenemos los datos espectroscópicos para proponer posibles compuestos, pero se demuestra con este estudio la presencia de varios metabolitos.

8. DISCUSIÓN

El tejocote *Crataegus mexicana* es una fuente natural de antioxidantes polifenólicos (García-Mateos y cols., 2012). La presencia de la actividad antioxidante de la bebida de tejocote (*Crataegus mexicana*) antes de iniciar el proceso de fermentación alcohólica fue 84.23 % para DPPH y 87.83% en TBARS. Estos resultados son similares a los demostrados en previos estudios con respecto a la actividad antioxidante presente en *Crataegus mexicana*, donde el extracto de acetona a 100 pm fue el más activo, por DPPH se obtuvo 91.56% y por TBARS 80.84% (Méndez y cols., 2013).

El medio óptimo de fermentación alcohólica de la bebida de tejocote (*Crataegus mexicana*) es en medio artificial, es decir, se inocula el mosto con levadura seca *Saccharomyces cerevisie* (Dry Ale Yeast US 05) alcanzando un 12% Alc. Vol. Al mismo tiempo se conserva la actividad antioxidante se conserva en 84.34% evaluada por DPPH. Los resultados resultan favorables, ya que la condición ideal, es decir, el tipo de levadura empleada, son las ideales para conservar la actividad antioxidante y obtener altos porcentajes de volumen de alcohol. Estos resultados son similares a los de Guifen He y cols., en (2013), en el que por medio de una levadura seca (SIHA Active Yeast 3 *Saccharomyces cerevisiae* WET 136) fermentaron un vino de *Crataegus pinnatifida*, el cual, al terminar la fermentación alcohólica, el porcentaje de actividad antioxidante es de 60% evaluada por la misma técnica de DPPH y su contenido de alcohol es de 11.98% (v/v) (Guifen He y col., 2013). Otro trabajo que evaluó la actividad antioxidante de vinos, es el de Suárez en 2012, en el que las levaduras inoculadas favorecen la actividad antioxidante y la producción de componentes polifenólicos (Suárez y cols., 2012).

La presencia de metabolitos antioxidantes secundarios del tipo polifenólicos en la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) se observó por ABTS en un 95.32 ± 0.02 % (técnica más selectiva en cuanto a la capacidad de atrapamiento de los radicales libres del tipo polifenólico). Los compuestos polifenólicos presentes en la bebida fermentada proporcionan actividad antioxidante además de brindar características organolépticas a la bebida. En

trabajos similares realizados, se evaluaron las propiedades de los compuestos fenólicos en semillas de uva y se determinó que estos metabolitos secundarios juegan un papel importante en la determinación de las características organolépticas de las bayas y vinos (Robichaud y cols., 1990). En particular, contribuyen a las características del vino, como color, sabor, astringencia y amargor (Robichaud y cols. 1990), (Thorngate y cols., 1995). Así como también, se ha demostrado que las principales clases de flavonoides en uvas y vinos son las antocianinas, catequinas y procianidinas (Cabanis y cols., 1998). Otra técnica utilizada para la evaluación de actividad antioxidante fue TBARS, cuantificando la capacidad de inhibición de lipoperoxidación de la bebida alcohólica fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) en 95.32 ± 0.02 %, un trabajo similar que evaluó la actividad antioxidante en una bebida fermentada es el de Vincent en (2002), con el que determinó las capacidades *in vitro* de los polifenoles en el vino tinto, para inhibir la oxidación mediada por células de las lipoproteínas. El resultado obtenido por TBARS es de 91.7% de inhibición de la lipoperoxidación (Vincent y cols., 2002). Otro estudio que evalúa la presencia de actividad antioxidante en vinos sometidos a un proceso largo de fermentación es el de Hernández y cols., en (2006) que evaluó la actividad antioxidante de compuestos polifenólicos de 47 variedades de vinos a lo largo de 14 meses de maduración, y atribuye la presencia de la actividad antioxidante a los metabolitos polifenólicos ya que estos se lograron conservar, debido a que son altamente estables (Hernández y cols., 2006).

Una vez concluida la etapa de evaluación antioxidante, continuamos con la identificación de metabolitos secundarios antioxidantes presentes en la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*). Los resultados de este trabajo en cromatografía, muestran tres picos importantes; el 1, 3 y 7(ver en figura 15, pág. 66). Siendo el pico 3, el más representativo ya que, mediante espectrometría de masas presenta una relación de masa carga de $577 m/z$ con un pico base de $288.9 m/z$. El cual, concuerda con la estructura molecular de Procianidina B2. Al comparar con estudios de compilación de LC/UV y bibliotecas MS/MS, en el que utilizaron 39 estándares fenólicos y elucidaron metabolitos presentes en diferentes muestras fermentadas, se determinó la presencia de procianidina B2 (Cooks y cols., 2000), (Sánchez-Rabaneday cols., 2003), (Monagas y cols.,2005), (Loredana y cols., 2006), (Stöggel y cols.,

2004) el cual presentó una relación masa/carga de 577.3 m/z y un pico de 280 nm propio de procianidina B2. Otro trabajo que identifica a Procianidina B2 en una bebida fermentada de uva “vino” es el de Hernández y cols., (2008) por medio de cromatografía, tiempos de retención, espectros de UV y datos de parámetros espectrales UV que se compararon con los estándares de Procianidina. Los compuestos identificados fueron ácido gálico, procatequina, flavanoles, (+) catequina, (-) epicatequina y procianidinas B2, B3 y B1, entre otros (Hernández y cols., 2008). Posiblemente, la presencia de Procianidina B2 en la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) se debe a que uno de los principales compuestos fenólicos presentes en fruto del género tejocote (*Crataegus ssp.*) Son; epicatequina, agliconas y glucósidos de tipo B, procianidinas oligoméricas y flavanoles, ácidos fenólicos y flavonas C-glicosilo y se estima que el contenido total de compuestos fenólicos es más alto en las hojas y flores. Y que en los frutos predominan las procianidinas (procianidina B2 y Procianidina B1) (Baoru y cols., 2012). Otro ejemplo trabajo que muestra la presencia del metabolito secundario en *Crataegus* es Gabriela y cols., en (2000), en el que por medio de análisis cromatográfico de extractos de hojas y flores de *Crataegus spp.* reveló la presencia de procianidinas hasta un nivel tetramérico, esto fue usando las técnicas de LC-MS principalmente (Gabriela y cols., 2000). Otro trabajo que caracteriza a Procianidina B2 por medio de semillas de uvas es el de Jiang y cols., (2013), Procianidina B2, presentó un peso molecular de 577 m/z y monómeros de 289 m/z , identificadas por HPLC- masas (figura 20) (Jiang y cols., 2013). Estos estudios coinciden con la espectrometría de masas de la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) (figura 16).

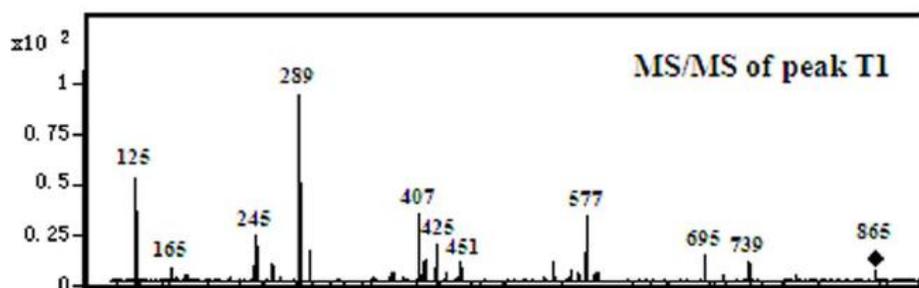


Figura 24. Identificación de Procianidina B2 (m/z) y su monómero 289 (m/z) formando la procianidina B2. A un pH 3 (Jiang y cols., 2013).

Consideramos necesario desarrollar estudios de elucidación de los principales metabolitos contenidos en la fermentación alcohólica de tejocote (*Crataegus mexicana*).

9. CONCLUSIONES

La bebida alcohólica fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) obtuvo un 12 % Alc. Vol. en un medio artificial con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) seca tipo Ale.

Se cuantificó la actividad antioxidante de la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*) por los métodos DPPH y ABTS en un 90 %, demostrándose así que la bebida mantiene las propiedades antioxidantes del fruto.

Respecto al proceso de inhibición de la lipoperoxidación se calculó más del 90% de eficiencia.

Por medio de HPLC- masas se identificó al metabolito polifenólico Epicatequina B2 en la bebida fermentada de tejocote (*Crataegus mexicana*).

10. PERSPECTIVA

Existe la necesidad de continuar con el mejoramiento sensorial de la bebida alcohólica por medio de análisis sensoriales (olor, sabor y aroma). Evaluar *in vivo* el desempeño y mecanismos de acción de la actividad antioxidante de la bebida fermentada. Determinar el tiempo óptimo de fermentación alcohólica buscando el menor tiempo y el máximo rendimiento de alcohol sin alterar las propiedades biológicas. Desarrollar estudios de la vida útil de la levadura para reutilizarla con la finalidad de abatir costos de producción a mayor escala. Estudiar los costos económicos de producción de la bebida fermentada de tejocote, así como, el mercado de consumo. Finalmente, realizar un estudio exhaustivo sobre la plena elucidación de los metabolitos antioxidantes presentes antes y después de la fermentación de la bebida alcohólica de tejocote (*Crataegus mexicana*).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Arango C. 2013. Biotechnological cultivation of edible macrofungi: An alternative for obtaining nutraceuticals. *Revista iberoamericana de micología*. 30.1: 1-8.
2. Argueta V, Cano A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. En Instituto Nacional Indigenista. México D.F. p.p. 1322-1323 Libro.
3. Banderas- Tarabay JA, Cervantes- Rodríguez M, Grada-Sánchez M, Espíndola- Lozano M, Iturbide D. 2015. Antioxidant mediated protective effect of hawthorn (*Crataegus mexicana*) peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *African Journal of Food Science*.
4. Bauman J. 1980. Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenolic compounds in relation to their O₂- scavenging properties. *Arch Pharm*. 313: 330-337.
5. Baoru Y, Pengzhan L. 2012. Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *Journal of the Science of food and agriculture*. 92: 1578–1590.
6. Bourgeois L. 1995. *Microbiología Alimentaria. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria*. Edit. Acribia S.A. Zaragoza.
7. Boulton RB, Singleton L, Bisson, Kunkee. 1996. *Principles and practices of wine making*. USA. Ed. Chapman & Hall.
8. Bengoechea T. 1995. Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal Chromatographia*. 1: 94-98.
9. Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol*. 52: 98-1111.
10. Cabanis JC, Cabanis MT, Cheynier V, Teissedre P. 1998. Caracterisation de la matière première et des produits élaborés. *Fondements scientifiques et technologiques*. 323-325.
11. Caliřkan O, Gündüz K, Serçe S, Toplu C, Kamilođlu O, řengül M, Erciřli S. 2012. Phytochemical characterization of several hawthorn (*Crataegus* spp.) species sampled from the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Pharmacogn*. 29.8: 16-21.

12. Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. 1990. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. Free radicals. Biol. Med. 9: 441-449.
13. Castro R, Martins R. 2004. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. Journal of Neuroscience Methods. 139:263-269.
14. Céspedes L, Mohammed E, Pavon N, Alarcon J. 2008. Antioxidant and cardioprotective activities of 1q extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia*. Food Chemistry. 2: 820-829.
15. Céspedes M, Rodríguez K, Llópiz NJ, Niurys M. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 19.3: 186-90.
16. .
17. Coimbra S, Castro E, Santos-Silva A. 2006. The effect of green tea in oxidative stress. Clinical Nutrition. 25.5: 790-796.
18. Cooks R, Caprioli R. 2000. Special Feature on electrospray ionization.. Journal Mass Spectrom. 35: 761-761.
19. Dell A, Galli G, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E. 2005. In vitro inhibition of human GMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. J Agric Food Chem. 53: 1960-5.
20. Dominguez M, Nieto A, Marin JC, Jeffery E, Céspedes Cl. 2005. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (scrophulariaceae). J. agric. Food Chem. 53:5889-5895.
21. Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley P. 2012. A review of the chemistry of the genus *Crataegu*. Phytochemistry. 79: 5-26.
22. Froehliera T, Hennebelle T, Martín-Nizard F, Cleenewerck P, Hilbert JL, Trotin F. 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. Food chem. 115: 897-03.
23. Formica JV, Regelson W . 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol. 33: 1061-1080.
24. Gabriela E. Rohr, Beat Maier, Otto Sticher. 2000. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part II. Liquid chromatography–mass spectrometry. Phytochemical Analysis. 11: 113-120.

25. García G. 2009. *Biotecnología Alimentaria*. Limusa Editorial. México DF. pp. 550.
26. García-Mateos R, Aguilar L, Soto M, Nieto R, Kite G. 2012. Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers *Crataegus* spp. From Mexico. *Agrociencia*. 46.7: 651-662.
27. García- Mateos R, Ibarra E, Nieto A. 2013. Compuestos antioxidantes en frutos de tejocote (*Crataeguss* pp.) de México. *REvista mexicana de Biodiversidad*. 84. 4: 1298-1304.
28. Gerhäuser C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Center*. 41. 13: 1941-1954.
29. Geronikaki A, Gavalas MA. 2006. Antioxidants and inflammatory disease: sunthetic and natural antioxidants with anti-inflamatory. En *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* . 18: 425-442.
30. Guifen He, Jialin S, Jinhua D, Jing L. 2013. Characteristics and antioxidant capacities of. *Journal Institute of Brewing*. 119: 321–327.
31. Guillen- Navarro GK, Márquez FJ, Sánchez JE. 1998. Producción de biomasa y enzimas lignolíticas por *pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoamericana Micol*. 15: 302-306.
32. Gutierrez J. 2000. *Ciencia bromatológica*. Madrid España. Díaz de Santos Editorial. p.p 178Libro.
33. Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*. 186: 1-85.
34. Hernandez F. 2008. Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS. *Trac-trend Anal Chem*. 27: 862–872.
35. Hernández T, Estrella I, Davinia C, Martín-Álvarez P, Moreno V. 2006. Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*. 2: 116-125.
36. Helrich K. 1990. *Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington. 15th ed. USA.
37. Higareda R, Salazar- Montoya M, Ramos-Ramírez EG. 1995. Conservación poscosecha del tejocote (*Crataegus mexicana*). *Revista Chapingo*. 1: 61-66.

38. Hoffmann E, Vincent S. 2007. Mass Spectrometry: Principles and Applications. Wiley Edit. p. 502.
39. Hollman P, Hertog M, Katan M. 1996. Role of dietary avonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans.* 24: 785-789.
40. Holm C, Langin D, Manganiello V, Belgrage P. 1997. Regulation of hormone-sensitive lipase activity in adipose tissue. *Meth Enzymol* . 286: 45 - 67.
41. Jaime H, Mendoza C, Rodríguez S, Carlos, Millán C. 2012. Concentración de clarificado de Uchuva (*Physalis peruviana*) por destilación osmótica: efecto de los parámetros de operación sobre la concentración. *Vitae.* 19. 1: 545-547.
42. Jiang X, Yajun L, Weiwei L, Lei Z, Fei M, Yunsheng W, Huarong T, Chaolin W. 2013. Tissue-Specific, Development-Dependent Phenolic Compounds. *Plos One* 8: 62315.
43. Jianping S. 2007. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. *Molecules.* 3: 679-693.
44. Joshi S. 1998. Amelioration of cytotoxic effects of idarubicin and 4HC on change liver cells by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Faseb Journal.* 12: 4484.
45. Kibanova D, Nieto-Camacho A, Cervini-Silvia J. 2009. Lipid peroxidation induced by expandable clay minerals. *Environ Sci Technol*; 43: 7550-7555.
46. Kim D. 2003. Vitamin C and equivalent antioxidant capacity of phenolics phytochemicals. *J Agric. Food Chem.* 13: 5450-5454.
47. Kim H. 2005. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L) oil and identification of its antioxidant constituents. *Journal Agric. Food Chem.* 20:7691-7695.
48. Kodja G, Harrison D. 1999. Interactions between No and reactive oxygenspecies: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1: 562-71.
49. Konigsberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. En *Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno
50. Kraus T. 2003. Linking chemical reactivity and protein precipitation to structural characteristics of foliar tannins. *Journal Chem Ecol.* 29: 703–730.

51. Kumar D. 2012. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Rev. Braz. J. Pharmacogn.* 22: 1187-1200.
52. Kumar N. 2009. Separation of proanthocyanidins isolated from tea leaves using high-speed counter-current chromatography. *Journal Chromatogr.* 1216: 4295–4302.
53. Kuskoski E. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 4: 726-732.
54. Lafon-Lafourcade, Peynaud E . 1957. Les vitamines B dans le raisin et dans le vin.
55. LeRoit D. 2003. *Diabetes Mellitus*. (2 ed.). México, D.F.: Mc-Graw Hill. Interamericana. México, D.F. p.p. 1331 [Libro](#)
56. Lichine A. 1980. *Enciclopedia des vins et des alcools*. Bouquins Editorial. France. p.p 994 [Libro](#).
57. Lien L, Chen P, Harnly J M. 2008. New phenolic components and fermented teas. *Journal Agr Food Chem.* 56: 8130–8140.
58. López-Santiago J. 2008. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* ssp). *Revista Chapingo.* 97: 111.
59. Loredana L, Torre G, Saitta M, Vilasi F, Pellicano T, Dugo G. 2006. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PAD and MS detection. *Food Chem.* 94: 640-650.
60. Loh K, Huang S, De Silva R, Tan B, Zhu Y. 2006. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res.* 3:4. 327-37.
61. Martínez M. 1998. *Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals*. España. Granada University.
62. Medic´- Saric´ M, Rastija V, Bojic´ M, Males Z. 2009. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutr Journal.* 22-23.
63. Méndez D, Cevantes M, Banderas AJ, Arguelles L, Hernández I. 2014. *Tópicos selectos de nutrición* (Primera ed.). México. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
64. Méndez-Iturbide D, Banderas-Tarabay JA, Nieto-Camacho A, Rojas-Chávez A, García-Meza G. 2013. Antioxidant capacity of extracts from hawthorn (*Crataegus mexicana*) skin. *African Journal of Food Science.* 7: 150-158.

65. Middleton IJ, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation, and cancer. *In* *Advances in Flavonoid Research*. Harborne Editorial. p.p.619–652 Libro.
66. Monagas M, Suárez R, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. 2005. Simultaneous determination of nonanthocyanins in phenolic compounds in wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal. Enol. Vitic.* 56: 139-147.
67. Mora F. 2010 . Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana* DC.) de Lerma y Ocoyoacac, México. *CIENCIA ergo-sum*.1: 61-66.
68. Nardini M, Natella F, Scaccini C, Ghisell A. 2006. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.1: 14-22.
69. Nieto AR, Borys MW. 2008. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* (Rosaceae subfam. Maloideae) en México. *Revista Chapingo. Ser. Horticultura* 14: 177-184
70. Ozcan M, Hacsefegogullari H, Marakoglu T, Arslan D. 2005. Hartown (*Crataegus* ssp) Fruit: Some physical and chemical proprieties. *Journal. Food Eng.* 4: 409-413.
71. Pérez-Gregorio R, González-Barreiro C, Ria-I Otero R, Simal-Gándara J. 2011. Comparison of sanitizing technologies on the quality appearance and antioxidant levels in onion slices. *Food Control.* 22: 2052–2058.
72. Renaud P. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet.* 8808: 1523–1526.
73. Robichaud JL, Noble A. 1990. Astringency and selected phenolics in wine. *Journal Sci. Food Agr.* 53:343-353.
74. Ross JA, Kasum, Christina M. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 22: 19-34.
75. Shao-Jiang S, Ling-Zhi L, Pin-Yi G, Peng Y, Jing-Yu Y, Chun-Fu W. 2011. Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Food Chem.* 129: 933–939.
76. Sónchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacuev C, Izquierdo- Pulido M. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* 38: 35-42.

77. Stöggel W, Huck M, Bonn C. 2004. Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection. *J. Sep. Sci*(27), 524-528.
78. Suárez J, Morata A. 2012. New trends in yeast selection. *Trends Food Sci. Technol.* 1: 39-50.
79. Shingh N, Rajini Ps. 2008. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chemixo-biological Interactions.* 173:97-104.
80. Thorngate I, Noble A. 1995. Sensory evaluation of Bitterness and Astringency of 3R (-). *Journal Sci. Food Agric.* 67:531-535.
81. Torres-Oquendo JD, Caballero B, Burgos JS, Fernández-Guines JM .2011. Análisis del aprovechamiento de subproducto de mango (*Mangifera indica* L.) para la obtención de compuestos farmacológicos y nutricionales. *Alimentaria.* 417: 95-98.
82. Valero MA, Vidal A, Burgos R, Clavo FL, Martínez C, Luengo Lm, Cuerda C. 2011. Meta-análisis del papel del licopeno en la diabetes mellitus tipo 2. *Nutr Hosp.* 26:1236-1241.
83. Vincent A, Rifici S. 2002. Lipoprotein Oxidation Mediated by J774 Murine Macrophages Is Inhibited by Individual Red Wine Polyphenols but Not by Ethanol. *The Journal of Nutrition.* 132.9: 2532-2537.
84. Vogel W. 2011. *Elaboración casera de la cerveza.* España: Zaragoza.

12. ANEXOS