



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00223

Matrícula: 2143802637

ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS  
FENÓLICOS NO EXTRAÍBLES DE  
*Cladocolea Toniceroides*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD DE IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

25 JUL 2016

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 21 del mes de julio del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA  
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ  
DRA. MARIA JOSE SERRANO MALDONADO  
DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
DE: JACOB MONTESINOS VELAZQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JACOB MONTESINOS VELAZQUEZ  
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

*[Signature]*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL

*[Signature]*  
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

VOCAL

*[Signature]*  
DRA. MARIA JOSE SERRANO MALDONADO

SECRETARIA

*[Signature]*  
DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA



# Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Análisis de los compuestos fenólicos no  
extraíbles de *Cladocolea loniceroides*

TESIS

Para obtener el grado de  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.BI. Jacob Montesinos Velázquez

Director:  
Dr. Jorge Soriano Santos

México, D.F., 21 de julio 2016.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001465”.

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca 570214.

México, D.F., a 21 de julio del 2016

El jurado designado por la  
Division de Ciencias biológicas y de la Salud Unidad Iztapalapa

Aprobó la tesis

**Análisis de los compuestos fenólicos no extraíbles de *Cladocolea  
loniceroides***

que presenta

I.BI. Jacob Montesinos Velázquez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano

Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesora: Dra. María José Serrano Maldonado

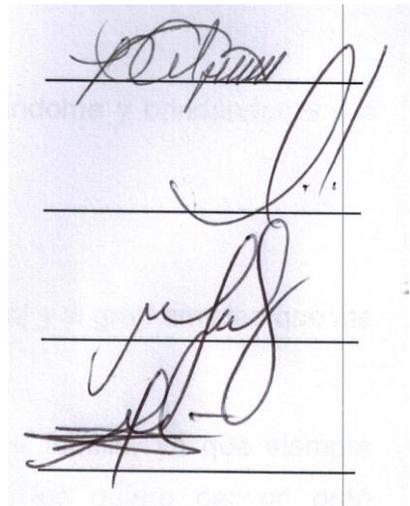
Jurado:

Presidente: Dra. Edith Ponce Alquicira.

Secretaria: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela.

Vocal: Dra. María José Serrano Maldonado.

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez.

The image shows four handwritten signatures in black ink, each written on a horizontal line. The signatures are cursive and vary in style. The first signature is at the top, followed by the second, third, and fourth at the bottom. The background is a light blue or greyish color.

## DEDICATORIAS

A mis padres Víctor y Sandra, especialmente a Sandra, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con libertades, pero al final de cuentas, siempre me motivaron para alcanzar mis metas. Me siento sumamente orgulloso de ser su hijo y de saber que siempre contaré con su apoyo incondicional. Sandra sé que todo el esfuerzo que has realizado a lo largo del tiempo ha valido la pena, porque juntos hemos logrado esto.

A mi hermano Alan, que es mi alegría, ya que en los momentos difíciles siempre tiene la palabra adecuada para dibujarme una sonrisa.

A mis abuelos Ismael y Rosaura, ya que más que mis abuelos, fueron las personas después de mis padres que más se preocupaban por mí. Me enseñaron muchas cosas importantes para tener una buena y siempre me encaminaron por el buen sendero.

A mi tía Patricia, que siempre estuvo conmigo apoyándome y brindándome sus sabios consejos.

A mi tío Edgardo, por la confianza infinita que tuvo en mí y su gran amistad que me dio.

Me siento sumamente orgulloso de pertenecer a esta familia, ya que siempre estuvieron presentes en el desarrollo de mi tesis, les quiero dar un gran agradecimiento por todo lo que me dieron en este tiempo. Los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco mucho al Dr. Jorge Soriano Santos, por aceptarme dentro de su laboratorio y así poder formar parte de este, por tener y brindarme siempre un consejo el cual me orientará a conseguir esta meta y sobre todo por ser un gran director.

A la Dra. María José Serrano Maldonado, por darme su asesoría a lo largo de este proyecto, por su confianza que siempre tuvo la cual me ayudo a conseguir este objetivo y sobre todo por brindarme su gran amistad.

A señor Rodrigo, por brindar una especial ayuda en la recolección del muérdago.

Muchas gracias, porque sin su gran apoyo y consejos este resultado no hubiera sido posible.

## RESUMEN

Los polifenoles no extraíbles tienen un papel relevante por sus efectos a la salud como actividad antiinflamatoria, reducción del estrés oxidativo, efecto antiproliferativo, efecto de vasodilatador, entre otros, por lo tanto la importancia de la contribución de esta fracción de polifenoles no extraíbles, que generalmente no se considera en el análisis químico cada vez toma un mayor interés. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar y evaluar la actividad antioxidante de la fracción de polifenoles extraíbles y no extraíbles del muérdago (*Cladocolea loniceroides*). Se investigó, se basó en la hoja, el tallo y el fruto en sus tres estados de madurez. Comparativamente, el contenido de polifenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico (eq. AG) de las diferentes partes de la planta resultó, mayor en el fruto verde y en el tallo ( $127.48 \pm 0.67$  y  $126.72 \pm 10.23$ , respectivamente). En el caso de los taninos hidrolizables y taninos condensados, la concentración de polifenoles totales se encontró en mayor concentración en el fruto verde ( $56.10 \pm 1.26$  mg eq AG/g) obtenidos por medio de la hidrólisis ácida, mientras que para la cuantificación de polifenoles totales extraídos con el método de Porter, la mayor concentración se encontró en la hoja ( $46.74 \pm 3.70$  mg eq. AG/g). Posteriormente se realizó la evaluación antioxidante por distintos métodos. Dando como resultado, que para los polifenoles extraíbles el tallo, el fruto verde, rojo y senescente presentaron la mayor capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) expresada como % inhibición =  $83.46 \pm 1.01$ ,  $86.25 \pm 2.28$ ,  $87.11 \pm 2.46$  y  $84.93 \pm 2.40$ , respectivamente. En el caso de los taninos hidrolizables, la hoja, el tallo, el fruto verde y rojo, presentaron la mayor capacidad antioxidante del radical DPPH<sup>•</sup>. Para los taninos condensados, la fracción que resultó tener la mayor capacidad de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> fue la obtenida con la hoja y el fruto senescente (% inhibición=  $83.82 \pm 1.63$  y  $84.43 \pm 2.45$ , respectivamente). Otra prueba de capacidad antioxidante realizada fue la actividad quelante de iones metálicos. De acuerdo con los resultados, los extractos de tallo y el fruto verde tienen la mayor capacidad quelante del ion Fe<sup>2+</sup> (% de quelación=  $87.09 \pm 0.11$  y  $90.36 \pm 0.26$ , respectivamente). Por otro lado, en los taninos hidrolizables, donde la fracción con

mayor capacidad quelante fue obtenida con el fruto verde, ya que se obtuvo el menor valor del IC<sub>50</sub> (2.41 mg eq. AG/g). Finalmente, se realizó la cuantificación de proantocianidinas totales para los taninos condensados. Lo cual arrojó como resultado, que el extracto del fruto verde presenta una mayor concentración (83.74 ± 3.32 mg/g). Los residuos del muérdago pueden ser útiles para la obtención de compuestos polifenólicos no extraíbles de las diferentes partes de la planta de diferentes estados de madurez. Estos polifenoles, principalmente taninos hidrolizables y condensados, presentan diferentes mecanismos de actividad antioxidante. Por lo tanto, estos compuestos tienen un gran potencial de aplicación en la formulación de productos con efecto terapéutico.

## ABSTRACT

The non-extractable polyphenols have an important role because they bring health effects as anti-inflammatory activity, reduction of oxidative stress, anti-proliferative effect, effect, vasodilator, among others, hence the importance of contribution of this fraction of this non-extractable polyphenols, which is generally not considered in the chemical analysis increasingly takes interest. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of mistletoe *Cladocolea Ioniceroides*. Such research was based on the leaf, stem and fruit in its three stages of maturity. Comparatively, the total polyphenol content expressed as mg gallic acid equivalents (eq. AG) of the different parts of the plant was higher in the green fruit and the stem ( $127.48 \pm 0.67$  y  $126.72 \pm 10.23$ , respectively). In the case of hydrolysable tannins and condensed tannins, the concentration of total polyphenols found in higher concentration in the green fruit ( $56.10 \pm 1.26$  mg eq AG/g) obtained through acid hydrolysis, while for the quantification of total polyphenols extracted with the method of Porter, the higher concentration is in the leaves ( $46.74 \pm 3.70$  mg eq. AG/g). Subsequently antioxidant evaluation was performed by different methods. Resulting in that for extractable polyphenols the stem, green, red and senescent fruit had the highest capacity reduction of DPPH radical expressed as % inhibition=  $83.46 \pm 1.01$ ,  $86.25 \pm 2.28$ ,  $87.11 \pm 2.46$  y  $84.93 \pm 2.40$ , respectively. In the case of hydrolysable tannins, the leaf, the stem, the green and the red fruit, they showed highest antioxidant capacity of DPPH radical. For condensed tannins, the fraction was found to have the highest capacity for radical reduction was obtained whit the leaf and the senescent fruit. (% inhibition=  $83.82 \pm 1.63$  y  $84.43 \pm 2.45$ , respectively). Another test was performed chelating activity. According to the results, extracts of stem and the green fruit have higher activity (% de quelación=  $87.09 \pm 0.11$  y  $90.36 \pm 0.26$ , respectively). On the other hand, in the hydrolysable tannins, where the fraction with highest capacity chelator was obtained with the green fruit, because the  $IC_{50}$  value was the lowest ( $2.41$  mg eq. AG/g). Finally, quantification of total proanthocyanidins for condensed tannins was performed. Which dropped as the results, the green fruit extract has a high concentration ( $83.74 \pm 3.32$  mg/g).

Mistletoe residues can be useful for obtaining polyphenolic compounds not extractable from different parts of the plant different maturity stages. These polyphenols, mainly hydrolysable tannins and condensed tannins have different mechanisms of antioxidant activity. Therefore, these compounds have potential application in the formulation of products with therapeutic effect.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1 Metabolitos secundarios de las plantas.	15
1.2 Características de los compuestos fenólicos extraíbles y los no extraíbles.	16
1.3 Taninos condensados e hidrolizables.	19
1.4 Métodos de obtención y evaluación de los compuestos fenólicos no extraíbles.	21
1.5 Metabolismo y efectos a la salud de los compuestos fenólicos no extraíbles.	22
1.6 Evidencias de la existencia de los compuestos fenólicos no extraíbles	23
1.7 Características de <i>C. Ionicerooides</i> y su composición química.	23
1.8 Efecto citotóxico de extractos acuosos de <i>C. Ionicerooides</i> sobre líneas celulares de cáncer de mama.	25
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
4.1 Objetivos particulares	27
<b>5. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
5.2 Extracción de Polifenoles extraíbles:	30
5.3 Extracción de polifenoles no extraíbles:	30
5.4 Cuantificación de polifenoles totales:	31
5.5 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> ):	31
5.6 Actividad quelante de iones metálicos	32

5.7 Determinación espectrofotométrica de PANE:	33
5.8 Determinación de compuestos polifenólicos no extraíbles mediante HPLC-MS:	34
<b>Análisis de resultados</b>	<b>35</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
6.1 Cuantificación de polifenoles totales	35
6.2 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> )	40
6.3 Actividad quelante de iones metálicos	45
6.4 Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (taninos condensados)	48
6.5 Determinación de compuestos polifenólicos no extraíbles mediante HPLC-MS:	51
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>57</b>
<b>Apéndice A</b>	<b>63</b>
<b>Apéndice B</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de acción de los antioxidantes.....	17
Figura 2 Unidad de repetición básica en taninos condensados .....	20
Figura 3. Efecto citotóxico <i>in vitro</i> del extracto acuoso del fruto de <i>C. loniceroides</i> sobre células ZR-75-1 de cáncer de mama ductal humano .....	25
Figura 4.- Reacción de reducción del radical DPPH <sup>•</sup> .....	32
Figura 5.- Reacción de quelación de ferrozina para la formación del complejo colorido.....	33
Figura 6.- Reacción de butanol/HCl a 100°C para la obtención de proantocianidinas. ....	34
Figura 7 Concentración de proantocianidinas (taninos condensados), en uva roja, polvo de cocoa, plátano ( <i>Pérez y col., 2013</i> ) y en el fruto verde ( <i>C. loniceroides</i> ). ....	50
Figura 8 Cromatograma obtenido tras el análisis del extracto realizado con la mezcla MeOH/acetona en el fruto verde. ....	51
Figura 9 Cromatograma obtenido tras el análisis del extracto realizado con la mezcla MeOH/acetona en el fruto rojo. ....	52
Figura 10 Cromatograma obtenido tras el análisis del extracto realizado con la mezcla MeOH/acetona en el fruto senescente.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Análisis químico proximal de hoja, tallo y fruto de muérdago ( <i>C. Ioniceroïdes</i> ). .....	24
Tabla 2 Concentración de polifenoles totales obtenidos tras la extracción con metanol en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto. ....	36
Tabla 3 Concentración de polifenoles totales obtenidos tras la extracción con acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto. ....	36
Tabla 4 Concentración de polifenoles totales obtenidos tras la extracción con metanol/acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.....	36
Tabla 5 Concentración de polifenoles extraíbles necesarios para inhibir el 50% de radicales libres de una solución. *Sierzant K. y Gabrielska J., 2010.....	38
Tabla 6 Concentración de taninos hidrolizables obtenidas tras la extracción metanol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.....	39
Tabla 7 Concentración de taninos condensados obtenidos tras la extracción por el método de Porter (BuOH/HCl) en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto. ....	39
Tabla 8 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH● y valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH●, obtenidos tras la extracción con metanol en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.....	40
Tabla 9 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH● y valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH●, obtenidos tras la extracción con acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.....	41

Tabla 10 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH● y valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH●, obtenidos tras la extracción metanol- acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.....	41
Tabla 11 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH● y valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH●, obtenidos tras la hidrólisis ácida en hoja, tallo y los tres estados de madurez del fruto. ....	42
Tabla 12 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH● y valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH●, obtenidos tras el método de Porter (BuOH/HCl) en hoja, tallo y los tres estados de madurez del fruto. ...	44
Tabla 13 Porcentajes de inhibición de radical DPPH●, valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH● y porcentajes de quelación de Fe <sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con metanol.....	45
Tabla 14 Porcentajes de inhibición de radical DPPH●, valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH● y porcentajes de quelación de Fe <sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con acetona.....	46
Tabla 15 Porcentajes de inhibición de radical DPPH●, valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH● y porcentajes de quelación de Fe <sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con acetona.....	46
Tabla 16 Porcentajes de inhibición de radical DPPH●, valores IC <sub>50</sub> de reducción DPPH● y porcentajes de quelación de Fe <sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con acetona.....	47
Tabla 17 Concentración de proantocianidinas no extraíbles obtenidas tras la extracción por el método de Porter (BuOH/HCl) en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.....	49

# **Análisis de los compuestos fenólicos no extraíbles de *Cladocolea loniceroides***

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Metabolitos secundarios de las plantas.**

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, son compuestos de bajo peso molecular y se denominan metabolitos secundarios. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (*Segler, 2001; Fiehn, 2002*).

Se agrupan en cuatro clases principales (*Taiz y Zeiger, 2006*):

- Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos. Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos. Saponinas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (*Wink, 1999*).

Los metabolitos secundarios no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción

de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de estos metabolitos se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros ( artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Cseke y col., 2006).

Como ya se mencionó antes, algunos de estos compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, sintetizando enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares. Asimismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante (Croteau y col., 2000).

Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas.

## **1.2 Características de los compuestos fenólicos extraíbles y los no extraíbles.**

En el caso particular de los compuestos fenólicos, se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas y son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Segler, 2001).

Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados (*Wink, 1999*).

Los polifenoles son importantes para la fisiología de las plantas pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas (*Buchanan y col., 2003*).

En el ser humano, parte de la actividad biológica de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular (figura 1).

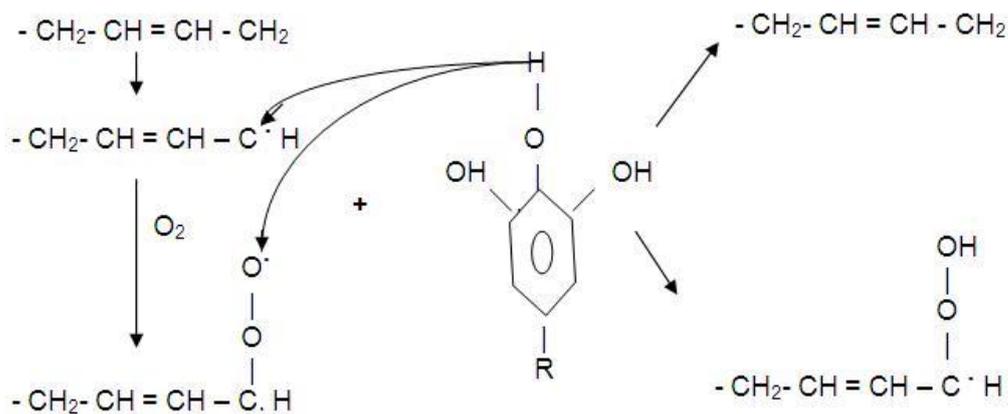


Figura 1 Mecanismo de acción de los antioxidantes

Estos compuestos polifenólicos presentes en las plantas se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos. La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia. A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en los análisis (grasa, carbohidratos, clorofilas) (*Arranz, 2010*).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, los compuestos polifenólicos se pueden dividir en **polifenoles extraíbles (PE)**, aquellos que se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánicos y **polifenoles no extraíbles (PNE)**, los que quedan retenidos en el residuo resultante tras la extracción acuoso-orgánica.

Los compuestos extraíbles poseen pesos moleculares bajos o medios (de monómeros a decámeros) mientras que los no extraíbles son compuestos con un peso molecular elevado (5000 unidades o mayores) o polifenoles de bajo peso molecular unidos a los componentes de la matriz de la fibra dietética o a proteínas que se encuentran en los residuos de dicha extracción acuoso-orgánica (*Bravo y col., 1994; Saura-Calixto y col., 2009*) o también pueden quedar atrapados en la matriz vegetal inaccesibles a los disolventes.

Según la estructura química de los polifenoles extraíbles, pueden dividirse en estructuras simples como son los ácidos fenólicos que a su vez pueden encontrarse libres o esterificados, en flavonoides y en otras estructuras mucho más complejas que a su vez se subdividen en proantocianidinas de bajo peso molecular (oligómeros de catequina y epicatequina con grado de polimerización entre 2 y 10) y taninos hidrolizables (*Saura-Calixto y col., 2009*).

Los polifenoles no extraíbles incluyen también taninos hidrolizables que a su vez pueden dividirse en galotaninos si la unidad monomérica es el ácido gálico y elagitaninos si es el ácido elágico o su dímero de condensación, el ácido hexahidroxidifenico (HHDF), polifenoles hidrolizables (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos que se unen a estructuras más complejas mediante enlaces glicosídicos) y proantocianidinas de alto peso molecular o también llamados taninos condensados (*Arranz, 2010*).

Los polifenoles no extraíbles y la fibra dietética están íntimamente asociados y ejercen una influencia mutua: primero, los polifenoles no extraíbles modifican la estructura de la fibra dietética, afectan propiedades tales como su peso molecular y solubilidad en agua. De hecho, una fracción significativa de polifenoles no extraíbles constituyen la fibra dietética.

La estructura y cantidad de los polifenoles está estrechamente ligada a su acción biológica, ya que influirá en la biodisponibilidad de estos compuestos y por tanto en sus efectos sobre diferentes partes del organismo.

### **1.3 Taninos condensados e hidrolizables.**

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas y se caracterizan por ser compuestos fenólicos, no nitrogenados y no cristalizables. Estos compuestos poliméricos se unen a proteínas desnaturalizándolas.

Sus propiedades principales están relacionadas con:

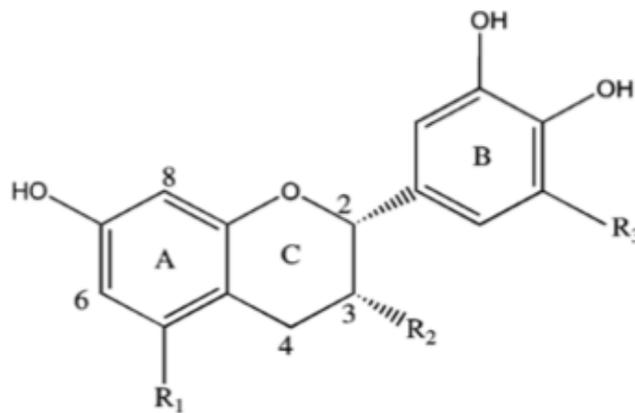
- La capacidad de formar complejos con las proteínas, que le confieren una característica gustativa interesante asociada al término globalmente conocido como astringencia.
- Su poder antirradicalario y su capacidad de consumir oxígeno disuelto, atribuyéndole su propiedad antioxidante, muy utilizada en la industria.
- Gracias a los grupos hidroxilo de sus núcleos fenólicos, pueden formar quelatos con cationes metálicos, pudiendo eliminar parcialmente, bajo esta forma, cantidades representativas de hierro y cobre disueltos.

Existen dos categorías de estos taninos: **taninos condensados y taninos hidrolizables** (*Vázquez y col., 2012*).

Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para obtener su estructura base, la cual puede ser antocianidinas o proantocianidinas. Sus múltiples grupos hidroxilos fenólicos provocan la formación

de complejos con las proteínas, con iones metálicos y con otras macromoléculas como polisacáridos (*Prior y Gu, 2005*).

El sustituyente o los grupos sustituyentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> pueden tener efecto sobre la reactividad del tanino (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.2**).



R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	Clase
OH	H	Proantocianidina
OH	OH	Prodelfinidina
H	H	Profisetinidina
H	OH	Prorobinetinidina

Figura 2 Unidad de repetición básica en taninos condensados

Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico o ácido elágico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente (*Ávalos y Pérez, 2009*).

- Galotaninos: Estos son compuestos complejos que consisten básicamente en un núcleo de glucosa o azúcar en otro núcleo, esterificados con ácido gálico y sus derivados, lo que lo hace soluble en agua. Los galotaninos han demostrado tener actividad antioxidante y antibacteriana (*Vázquez y col., 2012*).

- Elagitaninos: se componen de un núcleo poliol (glucosa o el ácido quínico) y esteres del ácido hexahidroxidifenico espontáneamente se reordena para formar la unidad de ácido elágico (*Hartzfeld y col., 2002*).

La importancia del análisis de los compuestos polifenólicos en los alimentos radica, no sólo en encontrar el mejor método de extracción sino también en la cuantificación e identificación completa y precisa de estos compuestos. Para ello existen numerosos métodos espectrofotométricos basados en diferentes principios químicos por los que se pueden cuantificar desde polifenoles totales hasta determinados grupos de compuestos (*Tomás-Barberán y col., 2001*).

#### **1.4 Métodos de obtención y evaluación de los compuestos fenólicos no extraíbles.**

Entre estos métodos se encuentran el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales (*Singleton y Rossi, 1965; Singleton y col., 1998*) o el método de la vainillina para determinación de proantocianidinas (*Okuda y col., 1989*) entre otros.

Sin embargo, a pesar de los intentos por desarrollar métodos sencillos de cuantificación en UV-VIS, la absorción de los compuestos polifenólicos se ve afectada por la naturaleza de los disolventes, el pH de los extractos y por otros compuestos que absorben en UV-VIS y que actúan como interferencias (*Georgé y col., 2005*).

De esta manera en los últimos años el análisis de polifenoles se basa en la utilización de métodos cromatográficos como la **cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)**, **cromatografía de gases (CG)** o **electroforesis capilar (EC)** acoplados muchas veces a **espectrometría de masas (MS)** (*Arranz, 2010*). Algunos autores empiezan a tomar en cuenta estos compuestos los cuales cuantifican e identifican, tras una despolimerización ácida y posterior tiólisis en el

residuo, estructuras correspondientes a flavan-3-oles y benciltioeteres analizadas por HPLC-ESI (ionización por electrospray)/MS (*García-Nava, 2007; Hellström y Mattila, 2008*).

## **1.5 Metabolismo y efectos a la salud de los compuestos fenólicos no extraíbles.**

Actualmente emerge la necesidad de conocer las estructuras de dichos compuestos no extraíbles para correlacionar las cantidades tan importantes presentes en algunas plantas con los posibles efectos biológicos que algunos autores ya han reportado como una actividad antiinflamatoria, la reducción del estrés oxidativo, el efecto antiproliferativo, el efecto de vasodilatador, entre otros (*Serrano y col., 2009; Knasmuller y col., 2009*). Para ello es necesario conocer el metabolismo que los compuestos polifenólicos pueden sufrir en el organismo y donde pueden ejercer sus efectos.

Los polifenoles no extraíbles forman un grupo de compuestos importantes desde el punto de vista nutritivo por dos razones: a) algunos de ellos pueden ser hidrolizados por enzimas del intestino delgado donde se vuelven bioaccesibles y potencialmente biodisponibles; b) la fracción que llega al colon puede liberarse de la matriz alimentaria por la acción de la microbiota colónica y transformado en compuestos polifenólicos pequeños y metabolitos que subsecuentemente son absorbidos. Puesto que los metabolitos microbianos se están reconociendo que tienen un papel relevante por sus efectos a la salud (como actividad antiinflamatoria, reducción del estrés oxidativo, efecto antiproliferativo, efecto de vasodilatador (*Pérez y col., 2013*)), la importancia de la contribución de esta fracción de polifenoles no extraíbles que generalmente no se considera en el análisis químico de los alimentos cada vez toma mayor importancia.

Finalmente la biodisponibilidad de los polifenoles no extraíbles se ha demostrado directamente determinando el contenido de polifenoles en plasma u orina o indirectamente evaluando la capacidad antioxidante en plasma (*Saura-Calixto y col., 2009*).

## **1.6 Evidencias de la existencia de los compuestos fenólicos no extraíbles**

El contenido de polifenoles reportados en la literatura se refiere normalmente a polifenoles extraíbles analizados en los extractos acuoso-orgánicos. Sin embargo, cantidades significativas de compuestos bioactivos que normalmente no se consideran en los estudios nutricionales permanecen en el residuo de la extracción de polifenoles como no extraíbles. Se tiene evidencia que en productos alimenticios de origen vegetal, existen compuestos no extraíbles en cantidades importantes. Tal es el caso del estudio realizado por *Arranz y col. (2009)*, en el cual se muestra que el contenido de polifenoles extraíbles para la manzana es de 18.8- 28 mg / 100 g de dicha fruta, mientras que el de polifenoles no extraíbles es de 112-126 mg / 100 g de la misma fruta; una cantidad mucho mayor.

Además se tiene evidencia de que los extractos tanto de polifenoles extraíbles como de los no extraíbles del muérdago europeo *Viscum album*, han sido usado para el tratamiento de muchas enfermedades, como medicina tradicional, reportando efectos biológicos como anticancerígeno, antimicrobiano, antiviral, inductor de apoptosis e inmunomodulador (*Adedayo y Gamiyu., 2008*).

## **1.7 Características de *C. Ioniceroides* y su composición química.**

El muérdago es una especie vegetal parásita de árboles que se nutre a través de órganos invasores llamados haustorios, los cuales penetran para formar interconexiones firmes con el tejido vascular del hospedero, a través del cual este

parásito obtiene sus nutrientes y agua, lo que le ocasiona una muerte lenta (Azuma y col., 2000; Cid- Villamil, 2006). Son arbustos por lo general dioicos, usualmente glabros, parásitos de plantas leñosas; tallos cilíndricos, erguidos, hojas laminares, opuestas; comúnmente flores dispuestas en racimos, corimbos; flores con un pequeño cálculo entero; fruto carnoso. Pueden presentar raíces epicorticales sobre el tallo, en la base de la planta o estar ausentes (Alvarado-Rosales y Saavedra-Romero, 2005). Este tipo de plantas tienen hojas verdaderas, por lo tanto, producen sus propios carbohidratos a través de la fotosíntesis (hemiparásitas), a pesar de ello, su grado de dependencia del hospedante es alto al extraer agua y sales minerales (Calder y Bernhardt, 1983, Alvarado-Rosales y col., 2009).

*Cladocolea loniceroides*, una de las 19 especies de este género, pertenece a la familia de las *Loranthaceae* que parasitan severamente, entre otros, a miembros del género *Salix* como el ahuejote (*Salix bonplandiana*) distribuido en la zona Chinampera de Xochimilco y en al menos 11 estados de la República Mexicana (Alvarado-Rosales y Saavedra-Romero, 2005; De la Paz y col., 2006).

En la tabla 1 se muestra el análisis químico proximal de hoja, tallo y fruto de *C. loniceroides* (Serrano y col., 2011).

Tabla 1. Análisis químico proximal de hoja, tallo y fruto de muérdago (*C. loniceroides*).

Componente	Hoja	Tallo	Fruto
g/100 g materia seca			
Cenizas	0.17 ± 0.00 <sup>1</sup>	6.59 ± 0.08	0.04 ± 0.00
Proteína cruda	19.08 ± 0.59	13.61 ± 0.3	12.65 ± 0.33
Extracto etéreo	4.22 ± 0.16	3.26 ± 0.82	28.44 ± 1.91
Fibra cruda	5.47 ± 0.37	14.80 ± 0.77	9.39 ± 0.92
Extracto libre de nitrógeno.	71.07	61.73	49.48

<sup>1</sup>Los valores mostrados representan la media de tres réplicas ± DE.

## 1.8 Efecto citotóxico de extractos acuosos de *C. loniceroides* sobre líneas celulares de cáncer de mama.

Serrano-Maldonado y col. (2011) evaluaron el efecto citotóxico del extracto acuoso del fruto de *Cladocolea loniceroides* sobre la línea celular ZR-75-1 de cáncer de mama ductal humano. En la figura 3 se muestra el efecto citotóxico sobre este cultivo celular y se observa que las concentraciones de extracto utilizadas (0.01–10 mg eq. de AG/mL) tienen un efecto letal sobre esas células cancerosas. La muerte celular se presentó desde la concentración más baja de extracto acuoso del fruto y el valor  $CL_{50}$  fue de 0.091 mg eq. AG/mL de medio de cultivo. El efecto letal puede relacionarse principalmente a la excelente actividad antioxidante que tiene *C. loniceroides*.

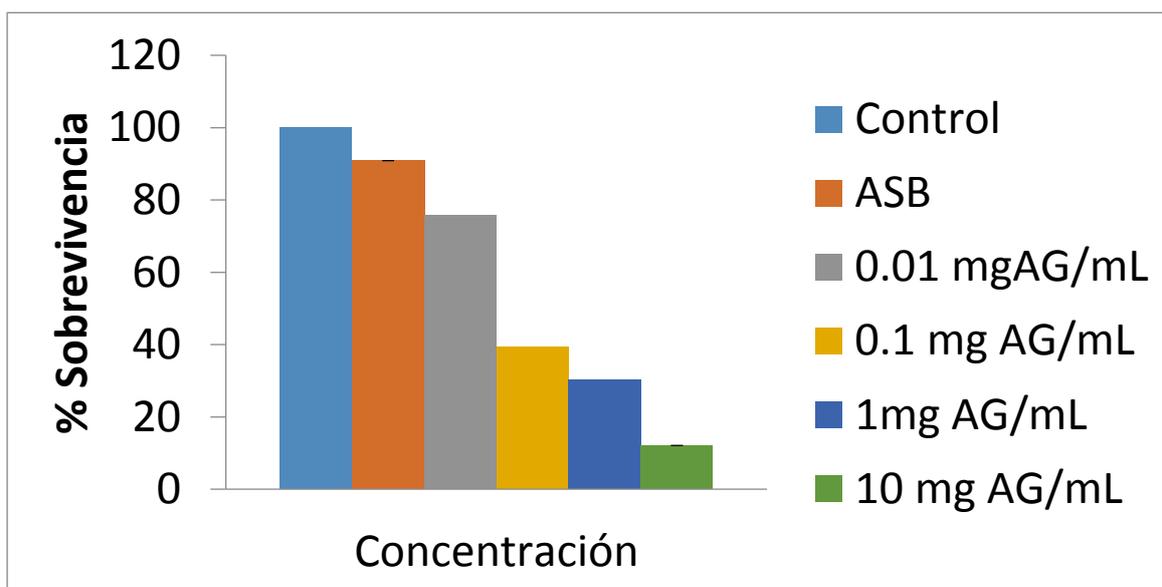


Figura 3. Efecto citotóxico *in vitro* del extracto acuoso del fruto de *C. loniceroides* sobre células ZR-75-1 de cáncer de mama ductal humano

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha vuelto evidente que los polifenoles no extraíbles son más abundantes que los polifenoles extraíbles de muchos alimentos y poseen una mayor capacidad antioxidante que los primeros. Como los polifenoles no extraíbles por lo general se ignoran del análisis químico de un alimento, es necesario, estudiar su composición química de manera que se avance en el conocimiento de esta fracción (*Arranz, 2010*).

Precisamente, su naturaleza no extraíble es la principal limitante para su cuantificación, por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos analíticos para su análisis (*Saura-Calixto y col., 2009*).

La microbiota colónica tiene la capacidad de transformar la fracción de compuestos fenólicos no extraíbles en compuestos polifenólicos pequeños y metabolitos que subsecuentemente son absorbidos y éstos a su vez se reconocen que tienen un papel relevante por sus efectos benéficos a la salud. Por lo tanto, la contribución de esta fracción de polifenoles no extraíbles, que generalmente no se considera en el análisis químico de los alimentos, cada vez toma mayor importancia.

El muérdago mexicano es una plaga, del cual se tiene poca información y su control no es el indicado, ya que la contaminación provocada por éste persiste. Aunado a esto, el estudio de la fracción de polifenoles no extraíbles de esta planta es nulo. Por lo anterior, se hace necesario realizar un estudio para el aprovechamiento de los compuestos polifenólicos no extraíbles que se encuentran en esta planta, para aumentar el conocimiento sobre esta planta, y tener un nuevo uso de los residuos de este muérdago, los cuales se procesarían para obtener productos con actividad biológica.

### **3. HIPÓTESIS**

*Cladocolea loniceroides* contiene polifenoles extraíbles, pero también es fuente de polifenoles no extraíbles, principalmente taninos hidrolizables y condensados, cuya capacidad reductora o antioxidante actúa en diferentes sistemas de óxido-reducción.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la fracción de polifenoles no extraíbles de *C. loniceroides* y evaluar su actividad antioxidante

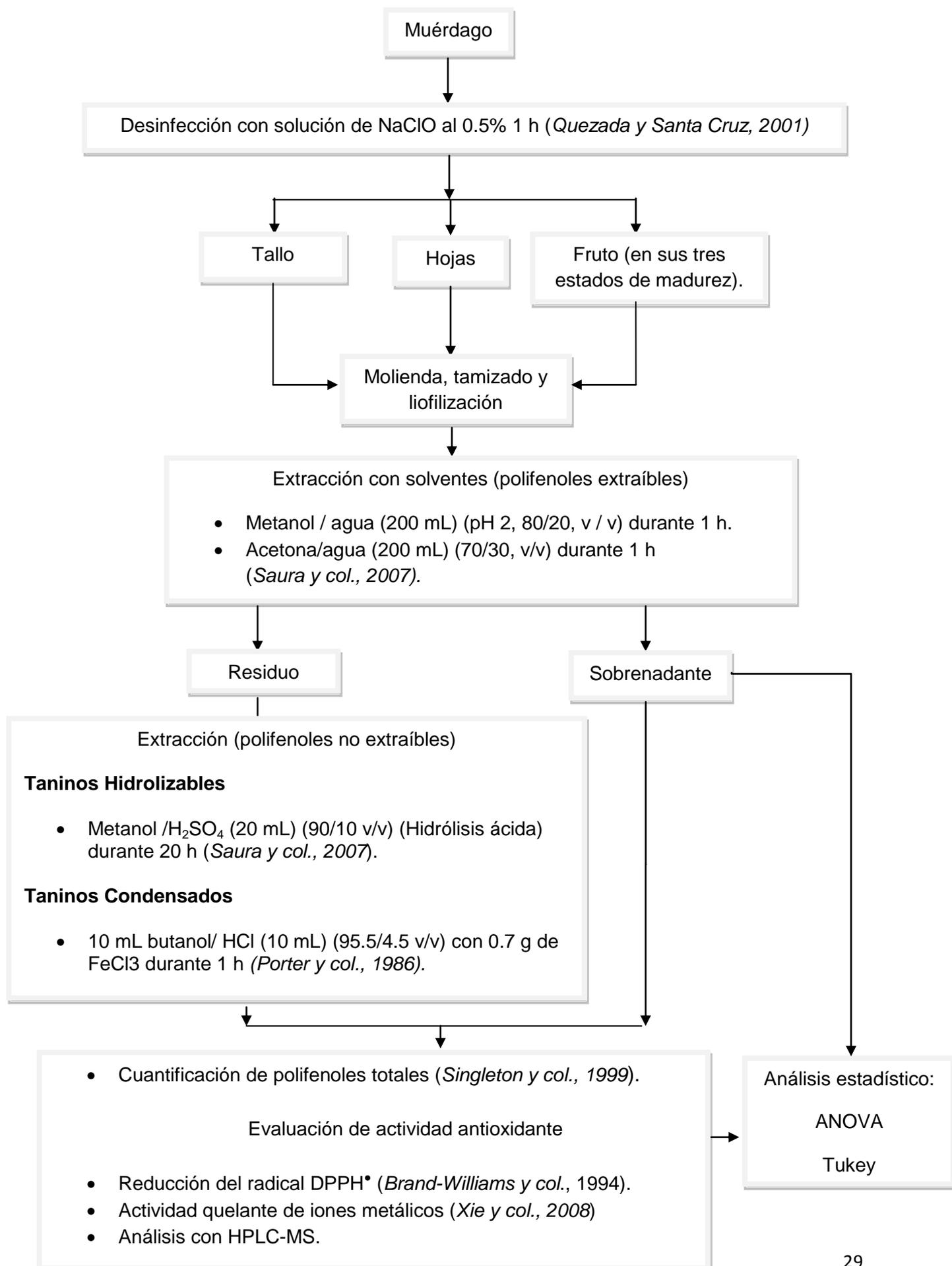
#### **4.1 Objetivos particulares**

- a) Poner a punto un método de cuantificación de compuestos fenólicos no extraíbles de *C. loniceroides*.
- b) Comparar la actividad antioxidante de extractos de polifenoles extraíbles y no extraíbles de *C. loniceroides*.
- c) Comparar la actividad quelante de iones metálicos de extractos de polifenoles extraíbles y no extraíbles de *C. loniceroides*.

## 5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1 Recolección de muérdago

*Cladocolea lonicerooides* fructificado se recolectó de árboles de *Salix bonplandiana* (Ahuejote) infestados, los cuales se hallaron en la zona del embarcadero "Nuevo Nativitas", Xochimilco, durante el mes de febrero de 2015. Se lavaron y desinfectaron, sumergiendo las ramas durante 1 h con solución de NaClO al 0.5%; posteriormente las hojas, tallos y frutos se secaron por separado a temperatura ambiente. Una vez secos las hojas, tallos y frutos por separado, se molieron haciéndolos pasar por un tamiz del número 60 (0.250 mm) y se liofilizaron (Quezada y Santa Cruz, 2001).



## **5.2 Extracción de Polifenoles extraíbles:**

En matraces de 250 mL, 5 g de muestra liofilizada, molida y tamizada (0.5 mm diámetro) se trataron en un primer paso con 200 mL de una mezcla de metanol/HCl/agua (160/36/4, v/v), pH 2 agitando constantemente durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm recogiendo el primer sobrenadante en matraces de 500 mL. Sobre el residuo se añadió 200 mL de una mezcla acetona/agua (140/60, v/v) y se procedió con la agitación y la centrifugación, de la misma manera obteniéndose un segundo sobrenadante que se combinó con el anterior (*Saura y col., 2007*).

## **5.3 Extracción de polifenoles no extraíbles (Taninos hidrolizables y condensados):**

Para la determinación de estos polifenoles no extraíbles, dos procedimientos de extracción se llevaron a cabo, donde los residuos de las extracciones previas se utilizaron.

A) La muestra (0.2 g) se colocó en un matraz, al cual se le añadió 20 mL de metanol /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90/10 v/v). El matraz se agitó a una temperatura de 85°C durante 20 h, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recolectó. Al residuo resultante se le aplicó este procedimiento dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos de cada extracción se mezclaron y se aforó hasta 50 mL (*Saura y col., 2007*).

B) Finalmente, 0.2g de muestra se trató con 10 mL de butanol/HCl (97.5/2.5 v/v) y con 0.7 g de FeCl<sub>3</sub> a 100°C durante 1 h. El matraz se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y se recogió el sobrenadante. Después el residuo se lavó dos veces con 5 mL de butanol y los sobrenadantes que se

obtuvieron se combinaron. La absorbencia se midió a 555 nm (*Porter y col., 1986; Reed y col., 1982*).

#### **5.4 Cuantificación de polifenoles totales:**

La cuantificación de polifenoles totales, se llevó a cabo con el reactivo de Folin–Ciocalteu, de acuerdo al método de *Singleton y col., (1999)*. La mezcla de reacción se formó con 500 µL del extracto diluido con 4.5 mL de agua desionizada; se agregó 200 µL de reactivo Folin–Ciocalteu y 500 µL de solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; después de agitar los tubos con un vórtex, se adicionó 4.3 mL de agua desionizada. La absorbencia se determinó a 765 nm en un espectrofotómetro después de que la mezcla de reacción se mantuvo durante 1 h en la oscuridad. El contenido total de polifenoles se calculó en mg equivalentes de ácido gálico (mg eq. AG), para lo cual se construyó una curva de calibración de 25 a 200 ppm de AG.

#### **5.5 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>):**

El DPPH<sup>•</sup> en su forma radical tiene color púrpura con una absorción máxima a 517 nm en espectrofotómetro de UV-Vis. En su forma reducida después de la acción de los antioxidantes sobre el radical, el DPPH<sup>•</sup> se torna de color amarillo. La reacción de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> se observa en la figura 4. El cambio de coloración de este compuesto se monitorea para determinar la concentración de antioxidantes en la muestra de estudio (*Brand-Williams y col., 1995*).



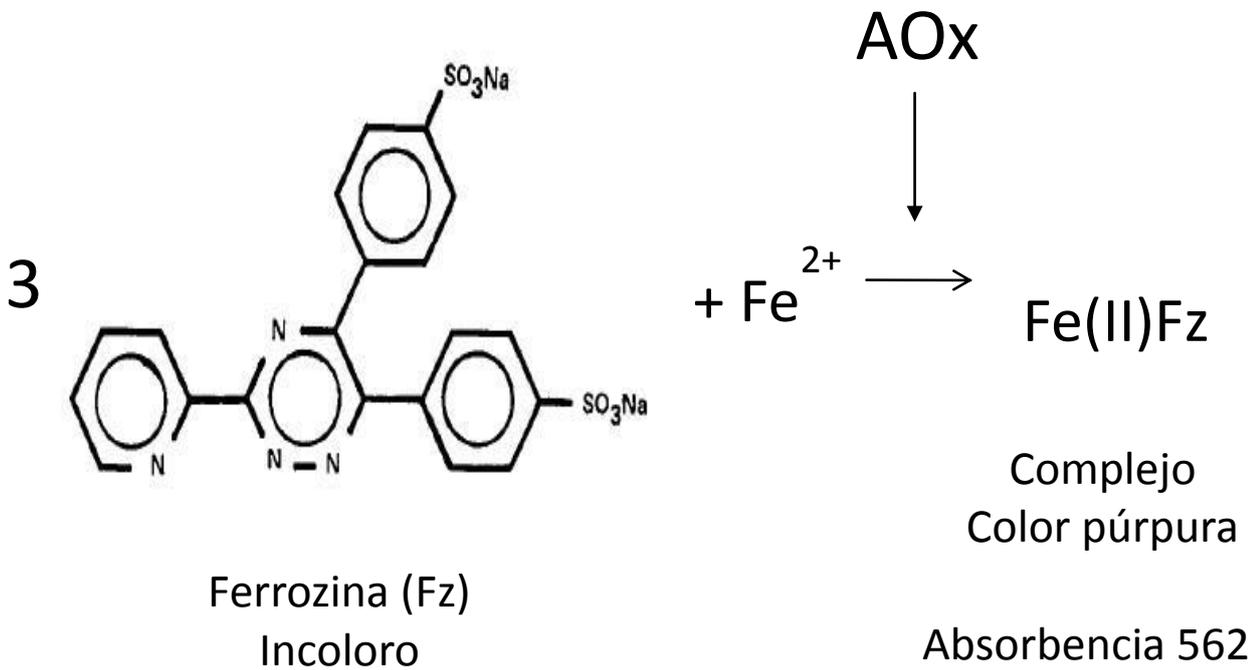


Figura 5.- Reacción de quelación de ferrozina para la formación del complejo colorido

Se mezcló 1 mL de solución muestra con 50  $\mu$ L de  $FeCl_2$  y 1.85 mL de agua destilada.

Después se agregaron 100  $\mu$ L de solución de ferrozina y se leyó la absorbencia a 562 nm.

Para determinar el porcentaje de quelación se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efecto quelante} = \left[ \frac{(Abs_{\text{control}562\text{nm}} - Abs_{\text{muestra}562\text{nm}})}{Abs_{\text{control}562\text{nm}}} \right] \times 100$$

### 5.7 Determinación espectrofotométrica de PANE:

Tras la hidrólisis ácida con butanol del residuo se obtiene es una solución rojiza de cationes flavilium, derivados de la depolimerización de PA como se observa en la figura 6. Se mide directamente la absorbencia a 555 nm y la cuantificación se

realizó con un patrón de concentrado de proantocianidinas (Curva patrón de algarrobo, la cual se muestra en el apéndice B).

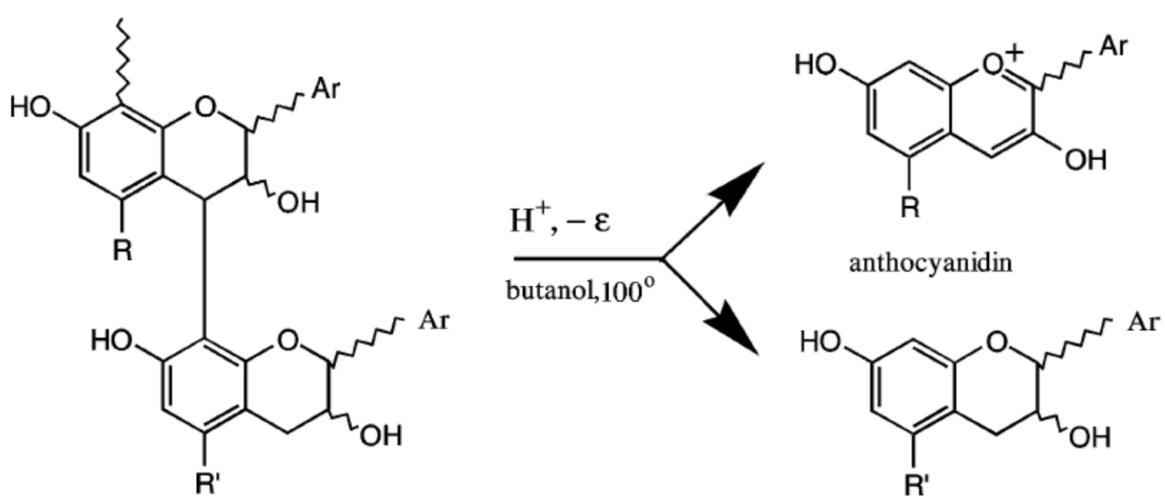


Figura 6.- Reacción de butanol/HCl a 100°C para la obtención de proantocianidinas.

## 5.8 Determinación de compuestos polifenólicos no extraíbles mediante HPLC-MS:

La composición química de cada fracción se determinó mediante un sistema Agilent Technologies Serie 1100 HPLC equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, y un detector de arreglo de diodos, acoplado a un espectrómetro de ESI de masas en tándem (microTOF-Q II) (Arun y Brindha, 2014). Los componentes se separaron mediante fase inversa, utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., tamaño de partículas 5 µm) con una columna de guarda C18. La fase móvil binaria consistió en ácido acético al 6% en acetato de sodio 2 mM (con un pH= 2.55, v/v, solvente A) y acetonitrilo (Disolvente B).

El disolvente A se preparó primero haciendo solución de agua de acetato de sodio 2 mM, para después ser mezclada con ácido acético en una proporción de 94:6 en volumen. Todos los disolventes se filtraron a través de una membrana de 0,45

$\mu\text{m}$  antes del análisis. La velocidad de flujo se mantuvo constante a 1,0 mL/min durante un tiempo total de 70 min (*Tsao y Yang, 2003*).

El sistema se corrió con programa de gradientes: 0-15% del solvente B durante 45 min, 15 a 30% de B durante 15 min, 30 a 50% de B durante 5 min, y 50 a 100% de B durante 5 min. El volumen de inyección de la muestra fue de 20  $\mu\text{L}$ . El detector se fijó en 555 nm. Los datos fueron adquiridos en modo MS/MS en modo automático de escaneo de exploración. Para aumentar la sensibilidad, reducir el ruido, y simplificar los espectros, se utilizó la ionización negativa (*Gu y col., 2002*). Los cromatogramas obtenidos se encuentran en un rango de 0-2500 m/z (relación masa/carga).

## **Análisis de resultados**

Se realizó el análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey de comparación múltiple de medias para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones y actividades de los diferentes extractos que se evaluaron en el muérdago estudiado.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Cuantificación de polifenoles totales**

Después de realizar la extracción en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto con metanol-acetona; se realizó cuantificación de polifenoles totales por medio del método de Folin-Ciocalteu (*Singleton y col., 1998*), donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Donde se puede ver que los resultados después de esta extracción son los siguientes:

Tabla 2.- Concentración de polifenoles totales obtenidos tras la extracción con metanol en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con MeOH	GAE (mg eq. AG/g)
Hoja	68.82 ± 1.22 <sup>a</sup>
Tallo	84.48 ± 0.97 <sup>b</sup>
Rojo	57.19 ± 0.85 <sup>c</sup>
Verde	95.61 ± 1.19 <sup>d</sup>
Senescente	54.10 ± 0.81 <sup>c</sup>

Tabla 3 Concentración de polifenoles totales obtenidos tras la extracción con acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con Acetona	GAE (mg eq. AG/g)
Hoja	34.42 ± 0.50 <sup>a</sup>
Tallo	42.24 ± 0.18 <sup>b</sup>
Rojo	27.69 ± 0.38 <sup>a</sup>
Verde	31.87 ± 0.48 <sup>a</sup>
Senescente	27.05 ± 0.26 <sup>a</sup>

Tabla 4 Concentración de polifenoles totales obtenidos tras la extracción con metanol/acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con MeOH/Acetona	GAE (mg eq. AG/g)
Hoja	103.24 ± 2.15 <sup>a</sup>
Tallo	126.72 ± 10.23 <sup>b</sup>
Rojo	84.88 ± 2.09 <sup>c</sup>
Verde	127.48 ± 0.67 <sup>b</sup>
Senescente	81.15 ± 1.55 <sup>c</sup>

Podemos observar que para la obtención de polifenoles extraíbles con el metanol-acetona obtenemos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las muestras y que además esta fracción de polifenoles se encuentra en una mayor concentración en el tallo y en el fruto verde,  $126.72 \pm 10.23$  y  $127.48 \pm 0.67$  mg eq. AG/g respectivamente, que en el resto de las partes del muérdago.

Comparativamente, los resultados obtenidos entre la fracción obtenida con metanol y la obtenida con acetona, la concentración es mayor en la extraída con metanol que la extraída con acetona, es decir, que encontramos una mayor cantidad de polifenoles polares que no polares.

Finalmente, se realizó una comparación de valores  $IC_{50}$  de la evaluación de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> entre las diferentes partes del muérdago (*C. loniceroides*) y el trigo sarraceno, como se observa en la tabla 5. Donde se puede observar la diferencia de comportamiento ante la evaluación antioxidante de cada extracto, a su vez el valor del  $IC_{50}$  ( $IC_{50} = 0.83$ ) muestra que en el caso del muérdago *Cladocolea loniceroides* el fruto verde tiene el menor valor de  $IC_{50}$ , dicho valor no solo es el más bajo en el muérdago, también es el valor menor comparado con los resultados obtenidos que se realizó en el trigo sarraceno por *Sierżant K. y Gabrielska J.*, 2010. Por lo tanto, el muérdago posee una alta capacidad antioxidante comparada con otro tipo de extractos obtenidos de alimentos.

Tabla 5 Concentración de polifenoles extraíbles necesarios para inhibir el 50% de radicales libres de una solución. \*Sierżant K. y Gabrielska J., 2010

<b>Extracto <i>C. Ioniceroides</i></b>	<b>Polifenoles extraíbles IC<sub>50</sub></b>	<b>Extracto trigo sarraceno (<i>Fagopyrum esculentum</i>)</b>	<b>Polifenoles extraíbles IC<sub>50</sub>*</b>
Hoja	3.31	Hoja	2.7
Tallo	2.41	Tallo	6.9
Fruto Rojo	1.22	Corteza	3.0
Fruto Verde	0.83	Cáscara	7.4
Fruto Senescente	1.57		

Se realizó la obtención de taninos hidrolizables y de taninos condensados por medio de los métodos antes mencionados (hidrólisis ácida y método de Porter (*Porter y col., 1986*), respectivamente) al residuo obtenido de la primera extracción. Al término dichas extracciones, se realizó la cuantificación de polifenoles totales por medio del método de Folin-Ciocalteau (*Singleton y col., 1998*), y lo que se obtuvo fue:

Donde podemos ver que los resultados después de estas extracciones son los siguientes:

Tabla 6 Concentración de taninos hidrolizables obtenidas tras la extracción metanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto

Extracto con MeOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	GAE (mg eq. AG/g)
Hoja	44.30 ± 0.74 <sup>a</sup>
Tallo	33.03 ± 1.43 <sup>b</sup>
Rojo	26.11 ± 0.33 <sup>c</sup>
Verde	56.10 ± 1.26 <sup>d</sup>
Senescente.	27.84 ± 0.25 <sup>c</sup>

Para la extracción de polifenoles no extraíbles con la hidrólisis ácida obtenemos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las muestras y que además esta fracción de polifenoles se encuentra en una mayor concentración en el fruto verde con una cantidad de  $56.10 \pm 1.26$  mg eq. AG/g que en el resto de las partes del muérdago.

Finalmente, se realizó la obtención de polifenoles no extraíbles con el método de Porter y su respectiva cuantificación y esto fue lo obtenido:

Donde se puede ver que los resultados después de esta extracción son los siguientes:

Tabla 7 Concentración de taninos condensados obtenidos tras la extracción por el método de Porter (BuOH/HCl) en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con BuOH/HCl/FeCl <sub>3</sub>	GAE (mg eq. AG/g)
Hoja	46.74 ± 3.70 <sup>a</sup>
Tallo	37.77 ± 1.97 <sup>b</sup>
Rojo	21.42 ± 2.76 <sup>c</sup>
Verde	20.02 ± 1.28 <sup>c</sup>
Senescente	21.36 ± 1.02 <sup>c</sup>

Podemos observar que para la extracción de polifenoles no extraíbles (taninos condensados) con este método obtenemos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las muestras y que además esta fracción de polifenoles se encuentra en una mayor concentración en la hoja que en el tallo y los tres estados de madurez del fruto.

## 6.2 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>)

Después de realizar la extracción en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto con metanol-acetona; se procedió a la evaluación del porcentaje de inhibición del radical DPPH<sup>•</sup> en cada extracción obtenida, donde se consiguieron los siguientes resultados:

En las tablas 8, 9 y 10 se detallan los porcentajes de inhibición de radical DPPH<sup>•</sup> (Xie y col., 2008) comparados entre cada extracto realizado con metanol, acetona y la mezcla con metanol-acetona.

Tabla 8 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH<sup>•</sup> y valores IC<sub>50</sub> de reducción DPPH<sup>•</sup>, obtenidos tras la extracción con metanol en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con MeOH	PFT (mg eq. AG/g)	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>
Hoja	68.82 ± 1.22 <sup>a</sup>	89.59 ± 3.56 <sup>a</sup>	1.01
Tallo	84.48 ± 0.98 <sup>b</sup>	89.97 ± 1.47 <sup>a</sup>	1.22
Rojo	57.19 ± 0.85 <sup>c</sup>	90.56 ± 1.90 <sup>a</sup>	0.66
Verde	95.61 ± 1.20 <sup>d</sup>	91.36 ± 2.07 <sup>a</sup>	0.74
Senescente	54.10 ± 0.81 <sup>c</sup>	87.07 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.93

Tabla 9 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH• y valores IC50 de reducción DPPH•, obtenidos tras la extracción con acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con Acetona	PFT (mg eq. AG/g)	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>
Hoja	34.42 ± 0.51 <sup>a</sup>	76.02 ± 3.38 <sup>a</sup>	1.05
Tallo	42.24 ± 0.18 <sup>b</sup>	80.54 ± 2.88 <sup>a,b</sup>	1.23
Rojo	27.69 ± 0.39 <sup>a</sup>	85.99 ± 1.87 <sup>b</sup>	0.53
Verde	31.87 ± 0.48 <sup>a</sup>	85.24 ± 0.58 <sup>b</sup>	0.65
Senescente	27.05 ± 0.27 <sup>a</sup>	79.76 ± 3.72 <sup>a,b</sup>	0.64

Tabla 10 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH• y valores IC50 de reducción DPPH•, obtenidos tras la extracción metanol- acetona en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con MeOH/acetona	PFT (mg eq. AG/g)	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>
Hoja	103.24 ± 2.15 <sup>a</sup>	73.93 ± 2.11 <sup>a</sup>	3.31
Tallo	126.72 ± 10.23 <sup>b</sup>	83.46 ± 1.01 <sup>b</sup>	2.41
Rojo	84.88 ± 2.10 <sup>c</sup>	87.11 ± 2.46 <sup>b</sup>	1.22
Verde	127.48 ± 0.68 <sup>b</sup>	86.25 ± 2.28 <sup>b</sup>	0.83
Senescente	81.15 ± 1.55 <sup>c</sup>	84.93 ± 2.40 <sup>b</sup>	1.57

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de múltiple de medias para determinar el método de extracción y la muestra que tiene una mayor capacidad de reducción del radical DPPH•. Por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , se concluyó que el extracto realizado al fruto en sus tres estados de madurez y al tallo, tienen la mayor capacidad de reducción del radical sin diferencias significativas entre ellas con  $87.11 \pm 2.46$ ,  $86.25 \pm 2.28$ ,  $84.93 \pm 2.40$  y  $83.46 \pm 1.01$ , respectivamente.

Estos porcentajes de inhibición corresponden a las concentraciones en equivalentes de ácido gálico de  $126.72 \pm 10.23$  mg eq. AG/g para el extracto del tallo,  $84.88 \pm 2.10$ ,  $127.48 \pm 0.68$  y  $81.15 \pm 1.55$  mg eq. AG/g para el fruto rojo, verde y senescente.

Las extracciones realizadas con este procedimiento, hechas en el fruto rojo y verde, tienen un valor  $IC_{50}$  menor que el resto de las partes de la planta, por lo que estos extractos reducen el 50% del radical con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Así, los extractos obtenidos del fruto rojo y verde presentan un mayor poder antioxidante evaluado bajo estas condiciones.

Se realizó la extracción de taninos hidrolizables y de taninos condensados por medio de los métodos antes mencionados (hidrólisis ácida y método de Porter, respectivamente) al residuo obtenido de la primera extracción. Se procedió a la evaluación del porcentaje de inhibición del radical DPPH• en cada fracción obtenida.

En las tablas 11 y 12 se detallan los porcentajes de inhibición de radical DPPH• comparados entre cada extracto realizado con metanol -  $H_2SO_4$  y con el método de Porter (BuOH – HCl).

Tabla 11 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH• y valores  $IC_{50}$  de reducción DPPH•, obtenidos tras la hidrólisis ácida en hoja, tallo y los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con MeOH/ $H_2SO_4$	PFT (mg eq. AG/g)	% Inhibición DPPH	$IC_{50}$
Hoja	$44.30 \pm 0.64^a$	$60.81 \pm 2.72^a$	2.29
Tallo	$33.03 \pm 0.22^b$	$65.88 \pm 4.15^a$	1.37
Rojo	$26.11 \pm 0.34^c$	$60.74 \pm 1.67^a$	1.32
Verde	$56.10 \pm 1.27^d$	$64.25 \pm 3.09^a$	2.38
Senescente	$27.84 \pm 0.25^c$	$50.16 \pm 2.42^b$	2.69

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de múltiple de medias para determinar el método de extracción y la muestra que tiene una mayor capacidad de reducción del radical DPPH<sup>•</sup>. Por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , se concluyó que el extracto realizado al fruto rojo, verde, a la hoja y al tallo, tienen la mayor capacidad de reducción del radical sin diferencias significativas entre ellas con  $60.74 \pm 1.67$ ,  $64.25 \pm 3.09$ ,  $60.81 \pm 2.72$  y  $65.88 \pm 4.15$ , respectivamente. Estos porcentajes de inhibición corresponden a las concentraciones en equivalentes de ácido gálico de  $33.03 \pm 0.22$  mg eq. AG/g para el extracto del tallo,  $44.30 \pm 0.64$  mg eq. AG/g para la hoja,  $26.11 \pm 0.34$  y  $56.10 \pm 1.27$  mg eq. AG/g para el fruto rojo y verde.

Las extracciones realizadas con este procedimiento, hechas en el fruto rojo y en el tallo, tienen un valor  $IC_{50}$  menor que el resto de las partes de la planta, por lo que estos extractos reducen el 50% del radical con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Así, los extractos obtenidos del fruto rojo y del tallo presentan un mayor poder antioxidante evaluado bajo estas condiciones.

Finalmente, se realizó obtención de polifenoles no extraíbles con el método de Porter y su respectiva evaluación del poder reductor del radical DPPH<sup>•</sup> (Xie y col., 2008) y esto fue lo obtenido:

Tabla 12 Valores de porcentajes de inhibición de radical DPPH● y valores IC<sub>50</sub> de reducción DPPH●, obtenidos tras el método de Porter (BuOH/HCl) en hoja, tallo y los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con BuOH/HCl/FeCl <sub>3</sub>	PFT (mg eq. AG/g)	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>
Hoja	46.74 ± 3.70 <sup>a</sup>	83.82 ± 1.63 <sup>a</sup>	1.01
Tallo	37.77 ± 1.97 <sup>b</sup>	81.91 ± 1.09 <sup>a,b</sup>	0.96
Rojo	21.42 ± 2.77 <sup>c</sup>	73.22 ± 2.19 <sup>c</sup>	0.39
Verde	20.02 ± 1.29 <sup>c</sup>	77.71 ± 2.61 <sup>b,c</sup>	0.27
Senescente	21.36 ± 1.02 <sup>c</sup>	84.43 ± 2.45 <sup>a</sup>	0.55

Por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , se concluyó que la extracción realizada al fruto senescente, a la hoja y al tallo, tienen la mayor capacidad de reducción del radical sin diferencias significativas entre ellas con  $84.43 \pm 2.45$ ,  $83.82 \pm 1.63$  y  $81.91 \pm 1.09$ , respectivamente. Estos porcentajes de inhibición corresponden a las concentraciones en equivalentes de ácido gálico de  $37.77 \pm 1.97$  mg eq. AG/g para el extracto del tallo,  $46.74 \pm 3.70$  mg eq. AG/g para el extracto de la hoja y  $21.36 \pm 1.02$  mg eq. AG/g para el fruto senescente.

Las extracciones realizadas con este procedimiento, hechas en el fruto rojo y en el verde, tienen un valor IC<sub>50</sub> menor que el resto de las partes de la planta, por lo que estos extractos reducen el 50% del radical con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Así, los extractos obtenidos del fruto rojo y del verde presentan un mayor poder antioxidante evaluado bajo estas condiciones.

### 6.3 Actividad quelante de iones metálicos

La actividad quelante que presentan los extractos, se determina con la variación del color púrpura del complejo formado con ferrozina. En presencia del antioxidante el  $\text{Fe}^{2+}$  la intensidad del color púrpura es menor y será proporcional a la concentración del antioxidante en la muestra (Xie y col., 2008).

En las tablas 13, 14, 15 y 16 se detallan los porcentajes de quelación del ion  $\text{Fe}^{2+}$  comparado entre los extractos obtenidos con metanol, acetona, metanol-acetona y con metanol –  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Tabla 13 Porcentajes de inhibición de radical DPPH•, valores  $\text{IC}_{50}$  de reducción DPPH• y porcentajes de quelación de  $\text{Fe}^{2+}$  obtenidos tras la extracción con metanol.

Extracto con MeOH	PFT (mg eq. AG/g)	% Inhibición DPPH	$\text{IC}_{50}$
Hoja	$68.82 \pm 1.22^a$	$89.59 \pm 3.56^a$	1.01
Tallo	$84.48 \pm 0.98^b$	$89.97 \pm 1.47^a$	1.22
Rojo	$57.19 \pm 0.85^c$	$90.56 \pm 1.90^a$	0.66
Verde	$95.61 \pm 1.20^d$	$91.36 \pm 2.07^a$	0.74
Senescente	$54.10 \pm 0.81^c$	$87.07 \pm 0.42^a$	0.93

Tabla 14 Porcentajes de inhibición de radical DPPH●, valores IC<sub>50</sub> de reducción DPPH● y porcentajes de quelación de Fe<sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con acetona.

Extracto con acetona	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>	% Quelación (Fe II)	IC <sub>50</sub>
Hoja	76.02 ± 3.38 <sup>a</sup>	1.05	78.58 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.20
Tallo	80.54 ± 2.88 <sup>a,b</sup>	1.23	81.38 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.17
Rojo	85.99 ± 1.87 <sup>b</sup>	0.53	81.53 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.77
Verde	85.24 ± 0.58 <sup>b</sup>	0.65	79.76 ± 0.13 <sup>a,b</sup>	0.62
Senescente	79.76 ± 3.72 <sup>a,b</sup>	0.64	78.31 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.24

Tabla 15 Porcentajes de inhibición de radical DPPH●, valores IC<sub>50</sub> de reducción DPPH● y porcentajes de quelación de Fe<sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con acetona.

Extracto con MeOH/Acetona	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>	% Quelación (Fe II)	IC <sub>50</sub>
Hoja	73.93 ± 2.11 <sup>a</sup>	3.31	79.04 ± 0.55 <sup>a</sup>	1.71
Tallo	83.46 ± 1.01 <sup>b</sup>	2.41	83.62 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.62
Rojo	87.11 ± 2.46 <sup>b</sup>	1.22	75.36 ± 0.36 <sup>c</sup>	1.37
Verde	86.25 ± 2.28 <sup>b</sup>	0.83	80.76 ± 1.13 <sup>a</sup>	1.26
Senescente	84.93 ± 2.40 <sup>b</sup>	1.57	73.45 ± 1.20 <sup>c</sup>	1.78

Tabla 16 Porcentajes de inhibición de radical DPPH•, valores IC<sub>50</sub> de reducción DPPH• y porcentajes de quelación de Fe<sup>2+</sup> obtenidos tras la extracción con acetona.

Extracto con MeOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>	% Quelación (Fe II)	IC <sub>50</sub>
Hoja	60.81 ± 2.72 <sup>a</sup>	2.29	69.21 ± 1.54 <sup>a</sup>	2.82
Tallo	65.88 ± 4.15 <sup>a</sup>	1.37	70.72 ± 1.51 <sup>a</sup>	2.67
Rojo	60.74 ± 1.67 <sup>a</sup>	1.32	69.16 ± 1.60 <sup>a</sup>	2.69
Verde	64.25 ± 3.09 <sup>a</sup>	2.38	70.71 ± 1.51 <sup>a</sup>	2.41
Senescente	50.16 ± 2.42 <sup>b</sup>	2.69	66.77 ± 1.31 <sup>b</sup>	3.09

Evaluar la capacidad quelante de iones metálicos es de suma importancia debido a que los metales son capaces de iniciar las reacciones de lipoperoxidación de ácidos grasos insaturados.

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias para determinar el método de extracción y la muestra que tiene una mayor actividad quelante. Por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , se concluyó que el extracto realizado al fruto verde y al tallo, tienen la mayor capacidad quelante del ión Fe<sup>2+</sup> sin diferencias significativas entre ellas con  $80.76 \pm 1.13$  y  $83.62 \pm 0.14$ , respectivamente. Estos porcentajes de inhibición corresponden a las concentraciones en equivalentes de ácido gálico de  $126.72 \pm 10.23$  mg eq. AG/g para el extracto del tallo y  $127.48 \pm 0.68$  mg eq. AG/g para el fruto verde.

Las extracciones realizadas con este procedimiento, hechas en el fruto rojo y verde, tienen un valor IC<sub>50</sub> menor que el resto de las partes de la planta, por lo que estos extractos quelan 50% de Fe<sup>2+</sup> con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Así, los extractos obtenidos

del fruto rojo y verde presentan un mayor poder quelante evaluado bajo estas condiciones.

Se realizó la extracción de taninos hidrolizables por medio del método antes mencionado (hidrólisis ácida) al residuo obtenido de la primera extracción. Se procedió a la evaluación del porcentaje de capacidad quelante de dicha fracción.

De acuerdo con la tabla 16, por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, se concluyó que la extracción realizada en los frutos rojo, verde, hoja y tallo, tienen la mayor capacidad quelante del ion  $\text{Fe}^{2+}$ , sin diferencias significativas entre ellas con  $69.16 \pm 1.60$ ,  $70.71 \pm 1.51$ ,  $69.21 \pm 1.54$  y  $70.72 \pm 1.51$ , respectivamente. Estos porcentajes de quelación corresponden a las concentraciones en equivalentes de ácido gálico de  $44.30 \pm 0.64$  mg eq. AG/g para el extracto de la hoja,  $33.03 \pm 0.22$  mg eq. AG/g para el tallo,  $26.11 \pm 0.34$  mg eq. AG/g para el fruto rojo y  $56.10 \pm 1.27$  mg eq. AG/g para el extracto del fruto verde.

Las extracciones realizadas con este procedimiento, hechas en el tallo y en el fruto verde, tienen un valor  $\text{IC}_{50}$  menor que el resto de las partes de la planta, por lo que estos extractos quelan el 50% del ion  $\text{Fe}^{2+}$  con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Así, estas fracciones obtenidas del fruto verde y del tallo presentan un mayor poder quelante evaluado bajo estas condiciones.

#### **6.4 Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (taninos condensados)**

El contenido de proantocianidinas (PA) en productos vegetales es generalmente determinado mediante HPLC en extractos acuoso-orgánicos. Sin embargo, existe una fracción de PA en el residuo de esas extracciones, llamadas proantocianidinas no extraíbles (PANE), que habitualmente no es tenido en

cuenta en los análisis. Por lo tanto se vuelve de importancia su cuantificación de dicha fracción, obtenida tras la extracción realizada por medio del método específico basado en la depolimerización con Butanol/HCl fue utilizado para cuantificar PANE en los residuos (*Porter y col., 1986*).

Después de realizar la extracción en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto con Butanol/HCl; se procedió a la cuantificación de proantocianidinas no extraíbles en cada fracción obtenida.

En la tabla 17 se detallan la cantidad de proantocianidinas no extraíbles obtenidas para cada parte de la planta y además se presenta de igual manera los porcentajes de inhibición de radical DPPH<sup>•</sup> obtenidos.

Tabla 17 Concentración de proantocianidinas no extraíbles obtenidas tras la extracción por el método de Porter (BuOH/HCl) en hoja, tallo y en los tres estados de madurez del fruto.

Extracto con BuOH/HCl/FeCl <sub>3</sub>	PFT (mg eq. AG/g)	Proantocianidinas (mg/g)	% Inhibición DPPH	IC <sub>50</sub>
Hoja	46.74 ± 3.70 <sup>a</sup>	50.13 ± 2.27 <sup>a</sup>	83.82 ± 1.63 <sup>a</sup>	1.01
Tallo	37.77 ± 1.97 <sup>b</sup>	21.91 ± 1.64 <sup>b</sup>	81.91 ± 1.09 <sup>a,b</sup>	0.96
Rojo	21.42 ± 2.77 <sup>c</sup>	64.93 ± 2.72 <sup>c</sup>	73.22 ± 2.19 <sup>c</sup>	0.39
Verde	20.02 ± 1.29 <sup>c</sup>	83.74 ± 3.32 <sup>d</sup>	77.71 ± 2.61 <sup>b,c</sup>	0.27
Senescente	21.36 ± 1.02 <sup>c</sup>	51.52 ± 2.20 <sup>a</sup>	84.43 ± 2.45 <sup>a</sup>	0.55

De acuerdo con el análisis de varianza y la prueba de comparación de múltiple de medias para la muestra que tiene la mayor concentración de proantocianidinas no extraíbles y la mayor capacidad de reducción del radical DPPH<sup>•</sup>. Por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de p<0.05, se concluyó que el extracto realizado al fruto verde, tienen la mayor cantidad de taninos condensados, con una concentración de 83.74 ± 3.32 mg/g.

La extracción realizada con este procedimiento, hecha en el fruto verde, tiene un valor IC<sub>50</sub> menor que el resto de las partes de la planta, por lo que este extracto reduce el 50% del radical con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Así, la fracción obtenida del fruto verde presenta un mayor poder antioxidante evaluado bajo estas condiciones.

Finalmente, se realizó una comparación entre distintas fuentes de proantocianidinas y en la figura 7 se puede observar dichos valores:

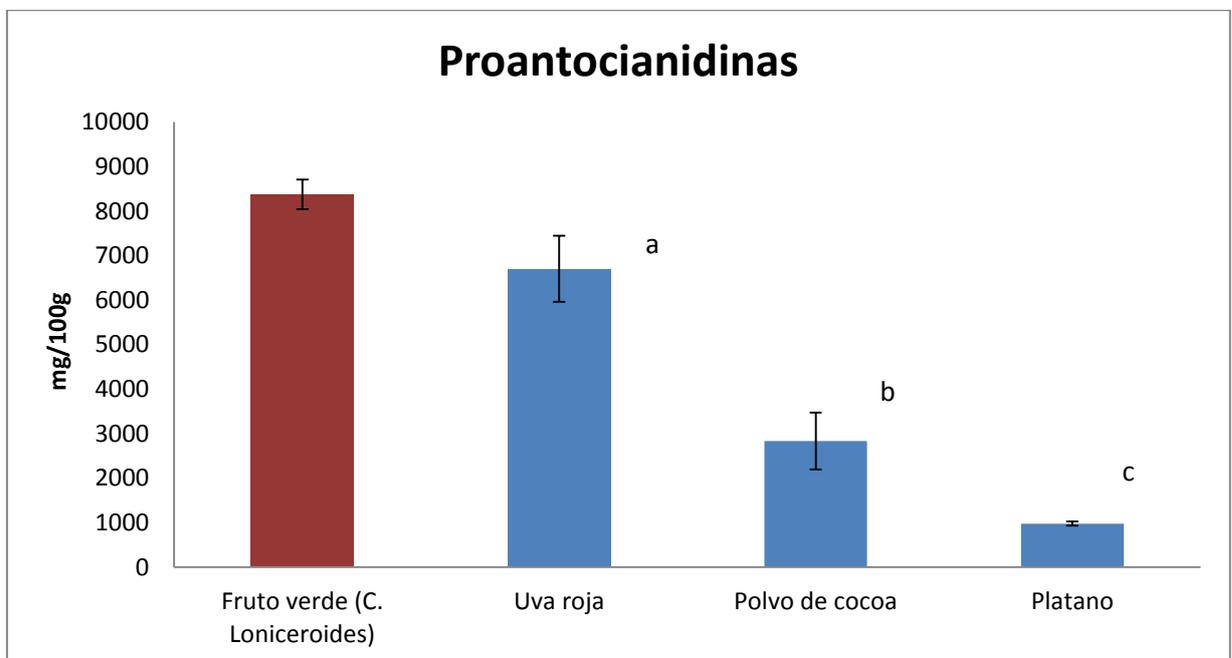


Figura 7 Concentración de proantocianidinas (taninos condensados), en uva roja, polvo de cocoa, plátano (Pérez y col., 2013) y en el fruto verde (*C. Loniceroides*).

Comparativamente, de acuerdo con la figura 7 se puede observar que es el fruto verde de *Cladocolea Loniceroides* el que posee la mayor concentración de proantocianidinas (8374 ± 332 mg/100g) que el resto de los extractos obtenidos de diversas fuentes alimenticias. Por lo tanto, se podría pensar en el fruto verde como una fuente alternativa para la obtención de proantocianidinas, para su posterior uso.

## 6.5 Determinación de compuestos polifenólicos no extraíbles mediante HPLC-MS:

Después de realizar la extracción en los tres estados de madurez del fruto (verde, rojo y senescente) con metanol/acetona; se procedió a la determinación de dichos compuestos mediante el uso del HPLC-MS.

En las figuras 8, 9 y 10 se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis realizado en el HPLC-MS sobre las fracciones de polifenoles extraíbles obtenidos de los tres estados de madurez del fruto.

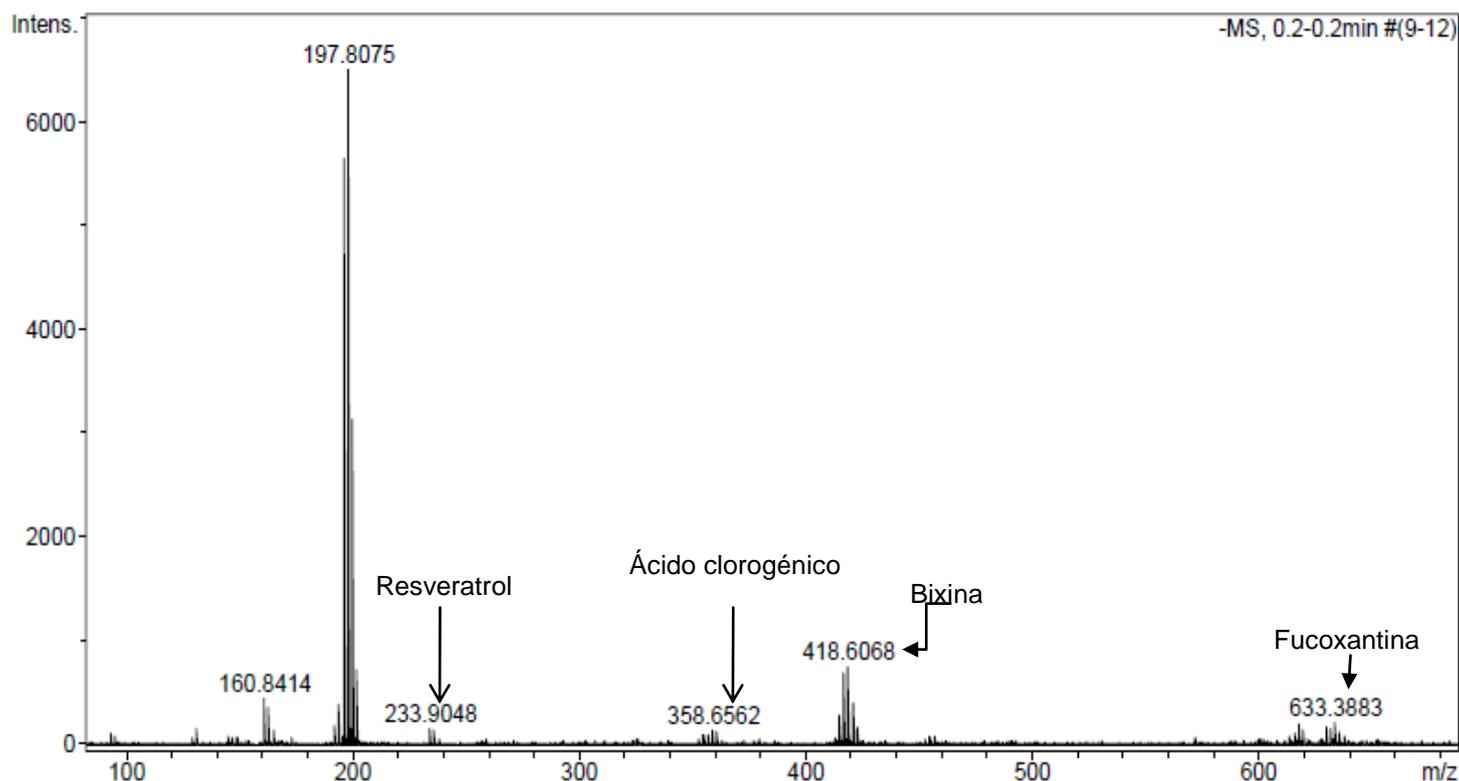


Figura 8 Cromatograma obtenido tras el análisis del extracto realizado con la mezcla MeOH/acetona en el fruto verde.

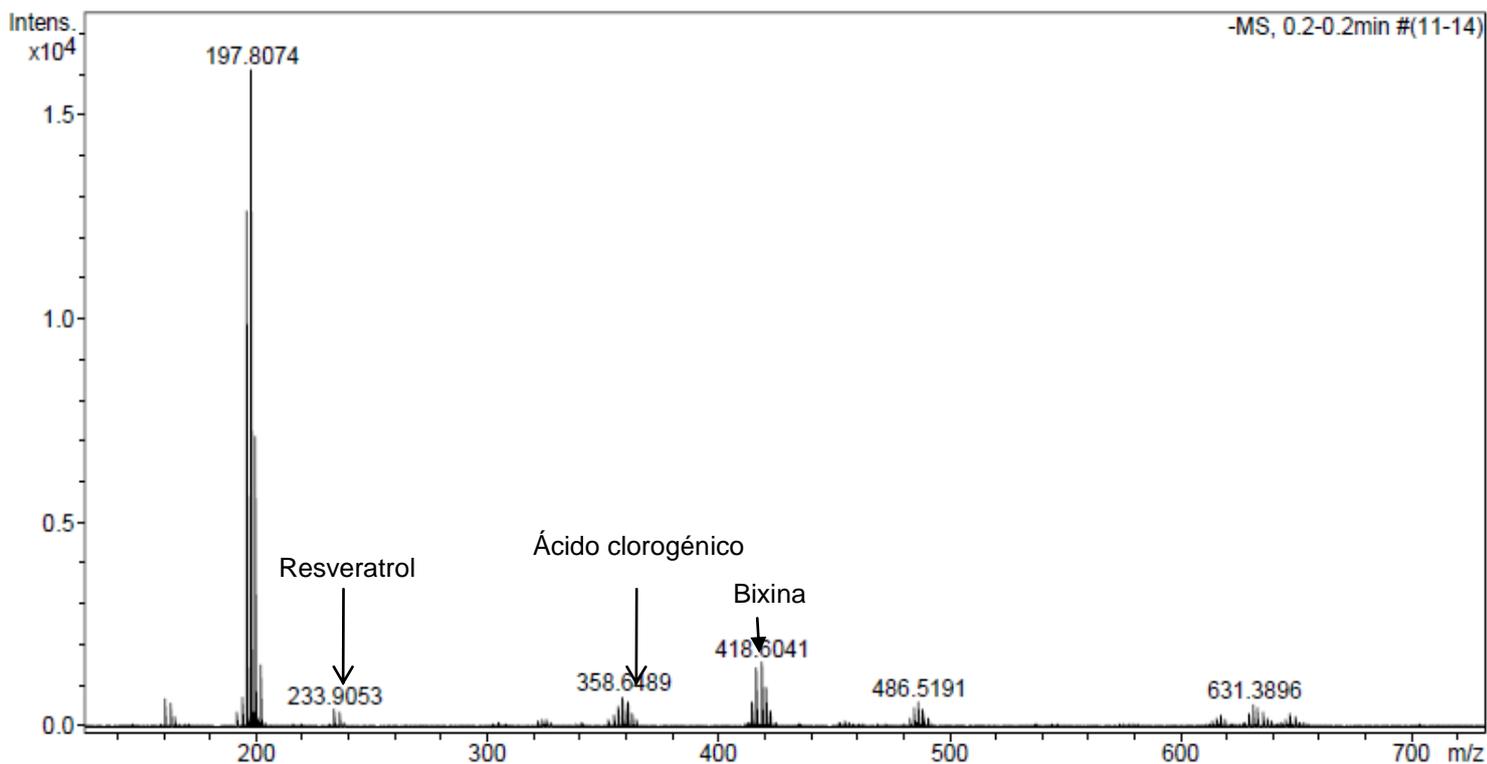


Figura 9 Cromatograma obtenido tras el análisis del extracto realizado con la mezcla MeOH/acetona en el fruto rojo.

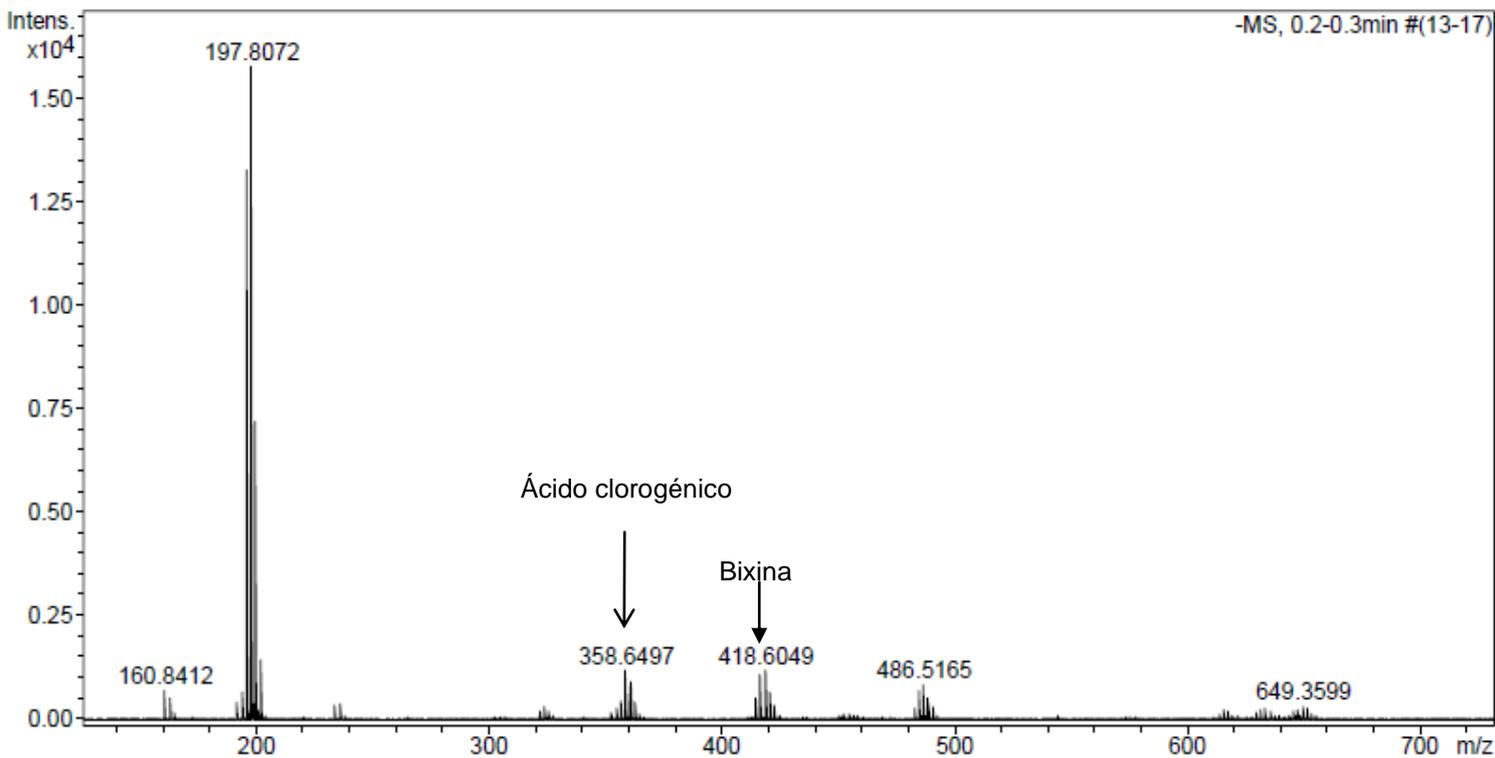


Figura 10 Cromatograma obtenido tras el análisis del extracto realizado con la mezcla MeOH/acetona en el fruto senescente.

Los cromatogramas obtenidos muestran una serie de compuestos de los cuales de acuerdo a su relación masa carga (m/z), se encuentran en un rango que va de 160 a 649.3 m/z.

La única similitud entre los tres cromatogramas fue la obtención de una serie de compuestos que tienen una relación masa/carga de 197.80, 358.64 y 418.51m/z, de los cuales no se encontraron similitudes con la base de datos con la que se comparó. Sin embargo, se encontraron algunos compuestos polifenólicos en dichos extractos que si fueron identificables, dichos compuestos son: el resveratrol, bixina, fucoxantina y el ácido clorogénico.

Con los datos obtenidos, se realizó una comparación con la base de datos de diferentes compuestos orgánicos con el cual cuenta el equipo. Lamentablemente, no muchos de los compuestos aquí presentados en los diferentes cromatogramas de los frutos tuvieron una coincidencia exacta con los encontrados en dicha base de datos. Por lo tanto, dicho análisis tendría que ser repetido o continuado para poder identificar definitivamente dichos compuestos orgánicos encontrados en estos polifenoles no extraíbles.

La zona chinampera de Xochimilco, considerada Patrimonio Cultural de la Humanidad es una zona que sufre graves problemas de contaminación, una de ellas es la infestación por el muérdago. El aprovechamiento de esta planta permite contrarrestar la contaminación ambiental provocada por sus residuos; además representa una oportunidad para controlar la plaga y así proteger a la flora de la Ciudad de México.

Existe muy poca información acerca de la composición, de la actividad antioxidante de *Cladocolea loniceroides*, por lo tanto el estudio de esta especie de muérdago es sumamente importante. Además, en el caso de la fracción de los polifenoles no extraíbles, no se tiene información de ninguna clase que se haya realizado en dicha planta y resulta ser relevante dicho estudio para poder contar

con mayor conocimiento sobre algunas propiedades que se consideran con las que cuenta este muérdago.

Finalmente, se contribuye al crecimiento y desarrollo del conocimiento científico de una especie endémica de México, que necesariamente debe de ser más estudiada por diversos organismos nacionales.

## 7. CONCLUSIONES

- Uno de los usos de los residuos del muérdago puede ser para la obtención de compuestos polifenólicos no extraíbles y de esta manera evitar su abandono a cielo abierto.
- Los residuos de muérdago son una fuente de polifenoles de diferente polaridad, a juzgar por su solubilidad en distintos sistemas de disolventes polares y no polares.
- Los polifenoles no extraíbles pueden incrementar el poder antioxidante de un extracto de *C. loniceroides* principalmente porque las proantocianidinas y antocianidinas, de los taninos condensados, poseen valores de IC50 menores a los de los otros polifenoles encontrados en los extractos.
- Los polifenoles extraíbles y no extraíbles de *C. loniceroides* mostraron tener poder reductor, principalmente transfiriendo electrones e hidrógenos, así como evitando la reacción de Fenton por su actividad quelante del ión ferroso.
- *C. loniceroides* es una fuente importante de polifenoles no extraíbles, los cuales se conoce que poseen propiedades farmacológicas útiles para la prevención o tratamiento de diferentes enfermedades.

## 8. RECOMENDACIONES

Para conseguir un mayor conocimiento sobre la fracción no extraíble de los polifenoles, así como su actividad antioxidante realizada a las diferentes partes del muérdago *C. Ioniceroides* (hoja, tallo y fruto), se sugieren las siguientes pruebas:

- Caracterizar parcialmente la composición de la fracción no extraíbles de los polifenoles de cada extracto obtenido.
- Continuar con el estudio de las proantocianidinas evaluando otros métodos de extracción de dichos compuestos.
- Comparar distintos métodos antioxidantes, con el objetivo de encontrar el más adecuado para el análisis de los taninos condensados.
- Evaluar el posible efecto citotóxico de estos polifenoles no extraíbles sobre líneas celulares de cáncer humano.
- Continuar con la caracterización de los compuestos que forman la fracción no extraíbles de los polifenoles.

## REFERENCIAS

Adedayo, A., Ganiyu, O., (2008). Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 7, 3138-3142 pp.

Alvarado–Rosales, D. Saavedra–Romero, L. y Cárdenas–Soriano, E. (2009). Anatomía de la interacción *Cladocolea loniceroides* (Van Tieghem) Kuijt – *Salix bonplandiana* Kunth. *Revista de Ciencias Forestal en México* vol.34 no.106. 5-9 pp.

Alvarado–Rosales, D. y Saavedra–Romero, L. (2005). El género *Cladocolea* (*Loranthaceae*) en México: Muérdago verdadero o injerto. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 11, 5–9 pp.

Arranz, S., (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación.(Tesis doctoral), Universidad complutense de Madrid.

Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., Kroon, P., (2009).High Contents of Non-extractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 7298-7303 pp.

Arranz, S., Saura-Calixto, F., (2010). Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*. 51, 313-318 pp.

Arun, K., Brindha P. (2014). Ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet-electrospray ionization-microTOF-Q II analysis of flavonoid fractions from *Jatropha tanjorensis*. *Pharmacognosy magazine*. 10 (39), 472-479 pp.

Ávalos, A., Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas.Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145 pp.

Azuma, J., Kim, N., Heux, L., Vuong, R. y Chanzy, H. (2000). The cellulose system in viscin from mistletoe berries. *Cellulose* 7, 3–19 pp.

Brand-Williams,W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1994).Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie* 28, 25-30 pp.

Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481-1487.

Buchanan, B., Grissem, W., and Jones, R. (2003). Biochemistry and Molecular Biology of Plants.Vol. 24. *American Society of Plant Physiologists*. Maryland, USA. 1367 pp.

Calder M. and P. Bernhardt (1983). The biology of mistletoes. Academic Press. Sidney, Australia. 348 p.

Cid–Villamil R. M. (2006). Biología del desarrollo de *Cladocolea Ioniceroides* (Van Tieghem) (Kuijt), *Loranthaceae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. México. 175 pp.

Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). 1250-1318 pp.

Cseke, L.J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.; Duke, J.A. y Brielman, H.L. (2006).Natural products from Plants.Second Edition.CRC press. Boca Raton, USA.

De la Paz P. O., C., J. Ceja R. y G. Vela R. (2006). Árboles y muérdagos: una relación que mata. *Contactos Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería* 59: 28–34 pp.

Fiehn, O (2002) Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155-171 pp.

García–Nava, M. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.

Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., (2002). Fractionation of polymeric procyanidins from low bush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal phase HPLC–MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4852–4860 pp.

Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1785-1790 pp.

Hellström, J. K., & Mattila, P. H. (2008). HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7617-7624.

Knasmuller, S.; DeMarini, D.M, Johnson, I. and Gerhauser, C. (2009). Tannins: Bioavailability and Mechanisms of Action Chemoprevention of Cancer and DNA

Damage by Dietary Factors, *Wiley-Blackwell*, Weinheim, Germany, pp. 499-508.

Okuda, T., Yoshida, T., & Hatano, T. (1989). New methods of analyzing tannins. *Journal of natural products*, 52(1), 1-31.

Pérez, J., Díaz, M., Saura, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research* 26 (2), 118-129 pp.

Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230 pp.

Prior, R. L., & Gu, L. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66, 2264–2280 pp.

Quezada, J. y Santa Cruz, M. (2001). Evaluación de la respuesta de la *Begonia rexa* la variación de medios y reguladores de crecimiento en técnicas de cultivo de hojas *in vitro*. *Bioquímica y Farmacia de Bolivia* 9, 79–84 pp.

Reed, J. D., McDowell, R. E., Van Soest, P. J., & Horvath, P. J. (1982). Condensed tannins: A factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33, 213–220 pp.

Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goní, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food and Chemistry*, 101, 492–501 pp.

Saura-Calixto, F., Serrano, J. & Goni, I. (2009). Definition of the mediterranean diet based on bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(2), 145-152.

Segler, D.S. (2001). *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer. Nueva York. Editorial Springer. 1-15 pp.

Serrano, J., Puupponen, R., Dauer, A., Aura, A., Saura, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (SUPPL. 2), 310-329 pp.

Serrano-Maldonado, M., Guerrero, I., de la Paz, C., Soriano, J. (2011). Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (*Loranthaceae*). *Revista Mexicana de Ingeniería. Química* vol.10 no.2 161-171 pp.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158 pp.

Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178 pp.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Fourth Edition. Sinauer Associates. USA.

Tsao, T., Yang, R., (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018 29-40 pp.

Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2001). HPLC - DAD - ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760 pp.

Vázquez, A., Alvarez, E., López, J., Wall, A., De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*. 5 N° 2, 84-94 pp.

Wink, M. (1999). *Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites*. pp. 1-17. In: M. Wink M. (Ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews*. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 pp.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X. y Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry* 111, 370–376 pp.

## Apéndice A

### Curva estándar en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

En la figura 1<sup>a</sup>. Se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

Así mismo, en la tabla A se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar y de esta forma poder determinar la cantidad de polifenoles totales en los diferentes extractos obtenidos del muérdago *C. Ioniceroides*.

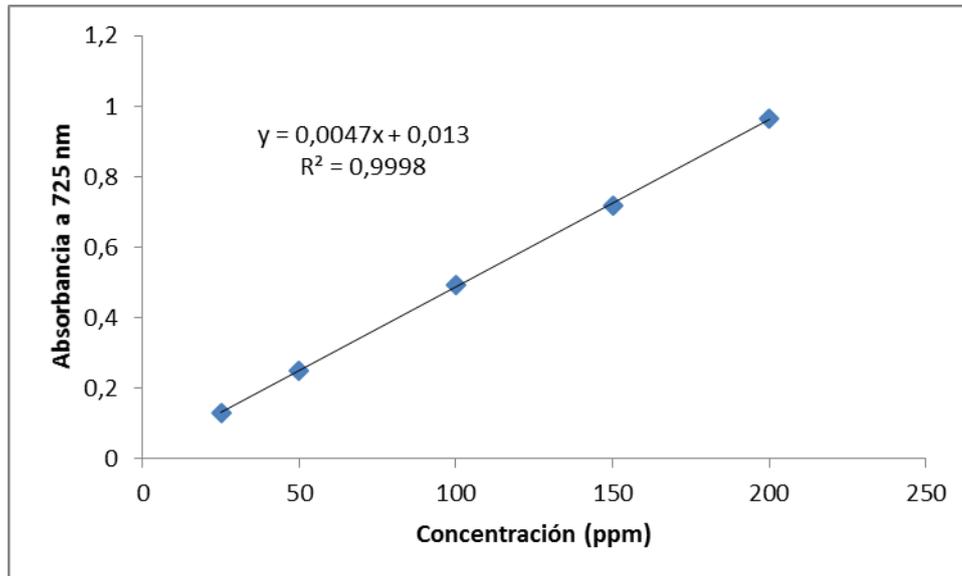


Figura 1<sup>a</sup>. Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

Tabla A. Concentraciones de ácido gálico para la construcción de la curva estándar de ácido gálico.

Ácido gálico (mg/L)	Absorbancia (725 nm)
25	0.131 ± 0.0089
50	0.251 ± 0.0030
100	0.492 ± 0.0065
150	0.717 ± 0.0045
200	0.966 ± 0.0017

## Apéndice B

### Curva estándar de algarrobo para la cuantificación de proantocianidinas totales.

En la figura 2<sup>b</sup>. Se muestra la curva de algarrobo (mg/g) de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de proantocianidinas totales.

Así mismo, en la tabla B se muestran las concentraciones de proantocianidinas utilizadas para la elaboración de la curva estándar y de esta forma poder determinar la cantidad de proantocianidinas totales en los diferentes extractos obtenidos del muérdago *C. Ioniceroides*.

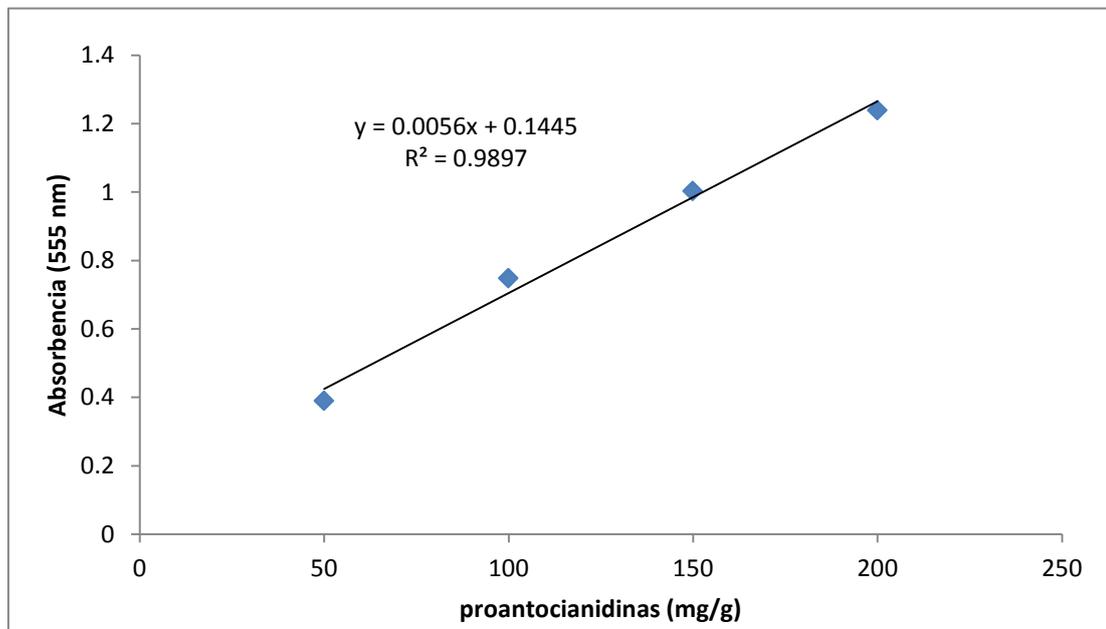


Figura 2<sup>b</sup>. Curva estándar de algarrobo para la cuantificación de proantocianidinas totales.

Tabla B. Concentraciones de proantocianidinas para la construcción de la curva estándar de proantocianidinas totales.

Proantocianidinas (mg/g)	Absorbencia. (555nm)
200	1.239 ± 0.0032
150	1.003 ± 0.0016
100	0.748 ± 0.0024
50	0.39 ± 0.0040