



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PARA EL  
APROVECHAMIENTO DEL MUÉRDAGO QUE INFESTA LA  
ZONA CHINAMPERA DE XOCHIMILCO**

**T E S I S**

Para obtener el grado de  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**I.A. María José Serrano Maldonado**

**Director  
Dr. Jorge Soriano Santos**

**México, D.F. julio 2010.**

“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 224739

México, D.F., a 12 de julio del 2010.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa  
aprobó la tesis

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PARA EL APROVECHAMIENTO DEL  
MUÉRDAGO QUE INFESTA LA ZONA CHINAMPERA DE XOCHIMILCO**

que presenta

I.A. María José Serrano Maldonado

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesor: Dra. Carmen De la Paz Pérez Olvera

Jurado:

Presidente:

Isabel Guerrero Legarreta



Secretario:

Francisco Cruz Sosa



Vocal:

Margarita Teresa de Jesús García Gasca



Vocal:

Gerardo Díaz Godínez



## DEDICATORIAS

A mis papás Laura y Eduardo, gracias por el apoyo, la motivación, la confianza y el amor. Gracias por darme la vida y por enseñarme que ésta se disfruta cuando hacemos lo que nos gusta. Sin duda, mi alegría más grande es tener el orgullo de ser su hija y además de tenerlos como amigos. Este trabajo es parte de los frutos de todo el esfuerzo que durante tantos años hemos hecho ustedes y yo, el logro es de todos.

A mis hermanos Lalo y Alex, que son mi motivación, mi alegría y mi apoyo, no concibo la vida y el sabor de mis éxitos sin ustedes.

A mis tíos Chela y José que son parte importante en mi vida por su cariño y apoyo.

A mi tía Silvia, gracias por la confianza, el amor y la amistad incondicional.

A mi tío Paco que siempre se ha preocupado por mi y que seguro disfrutará leyendo esta tesis.

A mi tío Oscar, que siempre estuvo al pendiente de los avances de este trabajo, nos brindó tardes inolvidables, nos dio sabios consejos y quiso ver la culminación de este proyecto. No me queda duda que desde otra perspectiva sigues al pendiente de todos y tus consejos nos seguirán acompañando siempre. Gracias por todo.

Me siento afortunada por tener una familia tan hermosa como esta, por ser parte de este valiosísimo grupo de personas que han hecho que luche y que trabaje para cumplir mis metas y que han ayudado a que mis sueños. Pero sobre todo, gracias por hacer que mi vida sea completamente feliz. Los quiero muchísimo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera importante al Dr. Jorge Soriano Santos, por darme la oportunidad de formar parte de su valioso equipo de trabajo, por darme la confianza para cumplir con este objetivo, por la dirección en el desarrollo de este hermoso trabajo y sobre todo por brindarme su gran amistad.

Al Dr. Mohammed El-Haffidi del Área de Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez, por la asesoría y el préstamo de sus instalaciones para la evaluación de la actividad biológica. Agradezco al bioterio del mismo Instituto, por la donación de las 30 ratas experimentales.

A la Dra. Teresa de Jesús García Gasca del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro por su asesoría y préstamo de sus instalaciones y equipos para la evaluación del efecto citotóxico. Además a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Biología Celular por recibirme con los brazos abiertos y brindarme su amistad, lo que hizo que mi estancia en Querétaro fuera muy agradable.

Muchas gracias, estos valiosos resultados no hubieran podido ser posibles sin su amable apoyo.

## RESUMEN

El muérdago es una planta parásita que se desarrolla en las ramas de árboles y arbustos. Produce un órgano llamado haustorio para tomar agua y sales minerales, ocasionando graves daños al hospedero afectando su desarrollo hasta causarle la muerte. A la fecha, no existe un estudio bioquímico amplio de muérdagos mexicanos lo que podría promover su control y aprovechamiento. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extractos de hojas, frutos y tallos del muérdago *Cladocolea (C) loniceroides* (van Tieghem) Kuijt, recolectado en la zona chinampera de Xochimilco, así como observar la actividad citotóxica *in vitro* en cultivo de células de cáncer de mama. Adicionalmente, este estudio será útil para darle un valor agregado y contribuir al conocimiento científico de esta planta. El análisis químico proximal de hojas, tallos y frutos mostró que el tallo contiene el mayor contenido de fibra cruda ( $14.80 \pm 0.77\%$ ) de la planta; la hoja el mayor contenido de proteína cruda y de carbohidratos ( $19.08 \pm 0.59\%$  y  $71.07\%$ , respectivamente) y el fruto el mayor contenido de extracto etéreo ( $28.4 \pm 1.90\%$ ). El fruto forma una sustancia viscosa que es soluble en éter etílico lo que eleva la concentración del extracto etéreo del análisis químico. La mayor concentración de polifenoles extraídos de hoja y tallo se obtuvo por extracción acuosa durante 5 min en ebullición. Sin embargo en el caso del fruto la extracción se realizó usando metanol con agitación constante durante 2 h a temperatura ambiente. También se realizó una saponificación previa a la extracción de polifenoles, pero en todos los casos el rendimiento fue menor que cuando no se saponificó. Comparativamente el contenido de polifenoles totales expresado como mg equivalentes de ácido gálico (AG) de las diferentes secciones de la planta resultó: fruto>hoja>tallo:  $189.5 \pm 4.9$ ;  $93.33 \pm 0.94$  y  $74.53 \pm 0.95$ , respectivamente. Se observó que los flavonoides no son los principales componentes de los extractos, lo cual sugiere que es necesario caracterizar con mayor precisión la naturaleza de éstos compuestos. Se estudió el comportamiento de los extractos obtenidos en diferentes sistemas de óxido-reducción para la evaluación de la actividad antioxidante. Se observó que el extracto metanólico del tallo presentó la mayor capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), expresada como % Inhibición =  $90.27 \pm 0.127\%$ . Sin embargo, el extracto acuoso del tallo presentó el menor IC<sub>50</sub> ( $0.065$  mg eq. Trolox/g), lo que indicó que una pequeña concentración de extracto es capaz de reducir al radical DPPH<sup>•</sup> eficientemente. La capacidad reductora del extracto acuoso del tallo en el sistema ABTS/lacasa (Deni Lite IIS) fue de  $39.84 \pm 0.4$  mg eq. AG/g; mientras que cuando se utilizó lacasa de *Rhus vernicifera* fue en el extracto metanólico del fruto ( $40.22 \pm 3.21$  mg eq. AG/g) en donde se obtuvo la mayor actividad antioxidante.

Todos los extractos, sin excepción, presentaron poder reductor en un sistema de óxido-reducción en el que se tomó como referencia al glutatión reducido (GSH). En particular los extractos metanólicos y por saponificación presentaron un poder reductor superior al del GSH en el mismo sistema; mientras que los extractos acuosos tuvieron un menor poder reductor que el GSH. Asimismo, todos los extractos presentaron actividad quelante ante el  $\text{Fe}^{2+}$  en un sistema *in vitro*, excepto el extracto obtenido por saponificación del fruto, en donde esta actividad fue nula. De la misma manera el extracto acuoso del fruto de muérdago administrado en ratas, a las que previamente se les indujo lipoperoxidación con  $\text{Fe}^{2+}$ , inhibió el deterioro de los lípidos, ya que no hubo diferencia significativa ( $p < 0.005$ ) entre las ratas de prueba y el grupo control debido a la capacidad que tienen los polifenoles de quelar metales. En todos los extractos de muérdago se cuantificó nitrógeno total por el método de Kjeldahl y proteína verdadera por el método del colorante ligado a la proteína. Sin embargo cuando los extractos se analizaron por electroforesis no se observó la presencia de bandas de proteína. Esto resultó diferente a lo reportado para *Viscum (V.) album* en el que se han detectado lectinas y viscotoxinas peptídicas. Lo anterior hace pensar que los compuestos antioxidantes de los extractos estudiados son polifenoles, algunos de ellos nitrogenados y/o compuestos no polifenólicos nitrogenados. En este estudio el contenido de polifenoles del fruto de *C. lonicerooides* observado fue 8 veces mayor que el reportado para *V. album* y al aplicarse a la línea celular ZR-75 de cáncer de mama ductal se observó de forma preliminar que tiene un efecto citotóxico con una  $\text{CL}_{50}$  entre 0.01 y 0.1 mg eq. AG/mL de medio de cultivo, a diferencia de *V. album* que debe su actividad citotóxica a la presencia de lectinas y viscotoxinas y no a los polifenoles.

El muérdago que infesta a la zona chinampera de Xochimilco fue clasificado como *Cladocolea lonicerooides*, una especie endémica de la región, considerada inútil hasta antes de esta investigación. Sin embargo, las pruebas realizadas a las hojas, tallo y frutos demostraron que contienen polifenoles de diversa naturaleza química, lo cual le confiere una gran actividad antioxidante. Pruebas *in vivo*, utilizando ratas como modelo experimental, mostraron que la actividad antioxidante inhibe la lipoperoxidación. Por otro lado, un extracto acuoso del fruto fue capaz de inhibir el desarrollo de un cultivo de células cancerosas de mama; lo cual indicaría que éste podría utilizarse para la obtención de un extracto estandarizado que contribuya a la prevención y tratamiento de dicho cáncer.

## ABSTRACT

Mistletoe is a parasitic plant which grows attached to and within the branches of trees and shrubs. It also produces a haustorium which grows in the host, mostly downwards, towards the source of water and mineral nutrients. The growth of the mistletoe haustorium restricts nutrient flow further along the host branch. Mistletoe impact is rather negative causing great tree mortality. To date there is not any research on Mexican mistletoes, which may promote their control and usefulness. Thus, the aim of the study was to investigate both *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Cladocolea (C.) Ioniceroides* (van Tieghem) Kuijt extract, as obtained of leaves, stems or fruits collected at the Xochimilco Lake so as to observe the *in vitro* cytotoxic activity against breast cancer cells. Additionally, this knowledge would be used to obtain an added-value product in the near future. The chemical proximal analysis of leaves, stem and fruits showed that the stem affords the plant's highest crude fiber content ( $14.80 \pm 0.77\%$ ); the leaves had the highest both crude protein and carbohydrates content ( $19.08 \pm 0.59\%$  and  $71.07\%$ , respectively), and the fruits registered the highest ether extract content ( $28.4 \pm 1.90\%$ ). It was also observed that the fruits exude a viscous substance, which is ethyl ether soluble, increasing the ether extract content. A boiling aqueous extraction of leaves and stem for 5 min afforded the highest polyphenols content. However, the polyphenols extraction from the fruits was carried out using metanol by shaking for 2 h at room temperature. The saponification reaction was also used in order to extract polyphenolics, but a further extraction of such compounds was poor. Leaves, stem and fruits extracts were assayed to assess total polyphenolics expressed in gallic acid equivalents (AGE; mg per g dry matter) as follows: fruits>leaves>stem:  $189.5 \pm 4.9$ ;  $93.33 \pm 0.94$  and  $74.53 \pm 0.95$ , respectively). Flavonoids did not occur as the main extract polyphenolics, for this reason it should be necessary to perform a detailed chemical analysis of these compounds to elucidate the nature of all of them. Regarding the behavior of the different extracts, this was assayed through different oxide-reduction systems in order to assess the antioxidant activity. It was observed that the stem methanolic extract showed the highest inhibition activity of formation of the radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), which was assessed as  $90.27 \pm 0.127\%$ . On the other hand the stem aqueous extraction observed the lowest IC<sub>50</sub> value ( $0.065$  mg eq. Trolox/g), which means that a low polyphenolics concentration is able to scavenge DPPH<sup>•</sup> efficiently. The stem aqueous extract registered the highest antioxidant activity measured by ABTS/laccase of Deni Lite IIS ( $39.84 \pm 0.4$  mg eq. AG/g) and fruit methanolic extract by ABTS/ laccase of Rhus vernicifera ( $40.22 \pm 3.21$  mg eq. AG/g). When the reducing power of all extracts was assessed, it was observed that these showed such activity in comparison to that of reduced glutathione (GSH),

which was used as a control into the oxide-reducing system. Particularly, methanolic and saponificated extracts showed a reducing power higher than that of GSH; while the aqueous extracts observed lower reducing power than that of GSH. Similarly all extracts showed *in vitro* Fe<sup>2+</sup> chelating activity, except the fruits saponificated extract, in which no activity was detected. When the chelating activity of a fruits aqueous extract was assessed *in vivo* by using rats with Fe<sup>2+</sup> induced lipoperoxidation this extract inhibited lipids oxidation because there were no significant differences (p<0.005) when compared to the rat control group. This is possible because polyphenols are metal chelators. Crude protein and true protein content in all extracts were assessed by both Kjeldahl and the dye-binding methods, respectively. However when the same extracts were analyzed by the electrophoresis method, no protein band was observed. This finding is different to that registered in *Viscum (V.) album* extracts, in which lectins and viscotoxins have been detected. Thus it may be inferred that the antioxidant compounds are polyphenols, some of them containing nitrogen and others do not. In this study the *C. lonicerooides* fruits polyphenols content was 8 times higher than that reported for *V. album*, so when an aqueous extract of the fruits was assayed on ZR75 breast cancer cells, it was observed that, in a preliminary test, it showed a citotoxic effect (LC<sub>50</sub>= 0.01 to 0.1 mg GAE/mL). This finding is different if compared to *V. album* extract because its citotoxic activity is linked to both lectins and viscotoxins as opposed to polyphenols.

Mistletoe had been deemed as a useless plant prior to this research. However, several trials carried out using the leaves, stem and fruits showed that these parts afforded different polyphenols, which makes it an excellent natural antioxidant resource. Furthermore, several *in vivo* assays using rats showed that the antioxidant activity inhibits lipoperoxidation because of polyphenols ability to chelate Fe<sup>2+</sup>. Additionally, an aqueous extract of the fruits was able to reduce the growth of ZR75 breast cancer cells, which may lead to obtain a standardized extract that might be used in the prevention and treatment of such cancer.

---

---

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Muérdago	1
1.2 Sustancias reactivas de oxígeno (ROS) y enfermedades crónico degenerativas	4
1.3 Antioxidantes	10
1.4 Actividad antioxidante	12
1.5 Métodos de cuantificación de la capacidad antioxidante	13
1.5.1 Métodos <i>in vitro</i>	13
1.5.1 Métodos <i>in vivo</i>	17
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>22</b>
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
5.1 Recolección de muérdago	23
5.2 Análisis químico proximal	25
5.3 Determinación de proteína verdadera	28
5.4 Electroforesis	29
5.5 Extracción de polifenoles totales	31



---

5.6 Cuantificación de polifenoles totales	32
5.7 Cuantificación de flavonoides	33
5.8 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> ).	34
5.9 Sistema ABTS / lacasa	35
5.10 Poder reductor	36
5.11 Actividad quelante de iones metálicos	36
5.12 Evaluación de actividad antioxidante <i>in vivo</i>	37
5.13 Evaluación de efecto citotóxico	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
6.1 Análisis químico proximal	45
6.2 Determinación de proteína verdadera y perfil electroforético	46
6.3 Cuantificación de polifenoles	48
6.4 Cuantificación de flavonoides	51
6.5 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> ).	54
6.6 Sistema ABTS/lacasa	56
6.7 Poder reductor	58
6.8 Actividad quelante contra Fe	60
6.9 Evaluación del efecto citotóxico	64
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>70</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>71</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>77</b>

---



Apéndice A	77
Apéndice B	78
Apéndice C	79
Apéndice D	80
Apéndice E	81
Apéndice F	82

---

---

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de especies reactivas del oxígeno por adición de electrones durante la reducción del oxígeno triplete hasta agua (Roberfroid, 1995).	6
Figura 2. Cinética de autoxidación e inhibición de la misma. Formación de radicales libres y acción de antioxidantes (Huang <i>et al.</i> , 2005).	13
Figura 3. Árbol infestado con <i>Cladocolea loniceroides</i> .	23
Figura 4. Detalle de <i>Cladocolea loniceroides</i> .	23
Figura 5. Estrategia experimental para la evaluación de la actividad antioxidante del muérdago <i>Cladocolea loniceroides</i>	24
Figura 6. Pesos moleculares del marcador SigmaMarker™	29
Figura 7. Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin Ciocalteu.	32
Figura 8. Reacción de flavonoides (rutina) con tricloruro de aluminio (O' Coinceanainn <i>et al.</i> , 2003).	33
Figura 9. Reacción de reducción del radical DPPH•.	34
Figura 10. Reacción de formación del radical ABTS por acción de la enzima lacasa.	35
Figura 11. Reacción de formación de complejo colorido con hexacianoferrato de potasio para la evaluación del poder reductor.	36
Figura 12. Reacción de quelación de ferrozina para formación de complejo colorido	37
Figura 13. Estrategia experimental para la evaluación de actividad antioxidante <i>in vivo</i> .	38
Figura 14. Estrategia experimental para la evaluación de TBARS en suero sanguíneo de ratas Wistar	39

---

Figura 15. Incubadora y cámara con atmósfera de CO <sub>2</sub> para cultivo de células ZR-75	41
Figura 16. Placa de 24 pozos para evaluación de efecto citotóxico de extracto de muérdago sobre línea celular ZR-75	42
Figura 17. Placa de 24 pozos con diferentes concentraciones de extracto de muérdago para evaluación de efecto citotóxico	43
Figura 18. Cámara de Neubauer para conteo de células ZR-75	43
Figura 19. Perfil electroforético SDS-PAGE de los extractos acuoso, metanólico y por saponificación de cada parte del muérdago. (1) marcador, (2) hoja acuoso, (3) fruto acuoso, (4) tallo acuoso, (5) hoja metanólico, (6) fruto metanólico, (7) tallo metanólico, (8) hoja saponificación, (9) fruto saponificación, (10) tallo saponificación.	47
Figura 20. Contenido de flavonoides con respecto al total de polifenoles en harina de hoja de muérdago	52
Figura 21. Contenido de flavonoides con respecto al total de polifenoles en fruto deshidratado de muérdago.	53
Figura 22. Contenido de flavonoides con respecto al total de polifenoles en harina de tallo de muérdago	53
Figura 23. Poder reductor de diferentes extractos de harina de hoja	58
Figura 24. Poder reductor de diferentes extractos de fruto deshidratado.	59
Figura 25. Poder reductor de diferentes extractos de harina de tallo.	59
Figura 26. Actividad quelante de cada extracto de harina de hoja de muérdago comparada con EDTA	61
Figura 27. Actividad quelante de cada extracto de fruto deshidratado de muérdago comparada con EDTA	61

---



Figura 28. Actividad quelante de cada extracto de harina de tallo de muérdago comparada con EDTA	62
Figura 29. Concentración de malondialdehído (MDA) en grupos de ratas con lipoperoxidación inducida.	64
Figura 30. Supervivencia de células ZR-75 bajo tratamiento con extracto de fruto de muérdago	65

---

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación bioquímica de los antioxidantes.	11
Tabla 2. Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE	30
Tabla 3. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE	30
Tabla 4. Composición del buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE	31
Tabla 5. Composición del medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle	40
Tabla 6. Análisis químico proximal del muérdago	45
Tabla 7. Determinación de proteína cruda y proteína verdadera de cada extracto de muérdago.	46
Tabla 8. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de harina de hoja de muérdago.	48
Tabla 9. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de fruto deshidratado de muérdago.	49
Tabla 10. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de harina de tallo de muérdago.	50
Tabla 11. Contenido de flavonoides en cada extracto.	51
Tabla 12. Porcentajes de inhibición de radical DPPH <sup>*</sup> y equivalentes en Trolox de cada extracto de muérdago.	54
Tabla 13. Valores IC <sub>50</sub> de reducción de radical DPPH <sup>*</sup> de cada extracto de muérdago.	55
Tabla 14. Evaluación del sistema ABTS/lacasa y ABTS/Denilite IIS de los extractos de muérdago.	56



Tabla 15. Resumen de la actividad antioxidante evaluada por tres métodos de óxido-reducción de los extractos acuoso, metanólico y por saponificación del muérdago. 57

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Muérdago

El muérdago es una planta que ocasiona graves daños a los árboles impidiendo su desarrollo hasta causarle la muerte. Parasita árboles y arbustos de diferentes familias sin que requieran de una determinada especie para hospedarse. Los muérdagos toman las sales y el agua del hospedero mediante órganos llamados haustorios (Cid *et al.*, 2005; De la Paz Pérez y Ceja, 2005) que le causan una muerte lenta o una mayor susceptibilidad a otras infecciones por insectos, hongos o bacterias. El haustorio va creciendo a través de los tejidos primarios y secundarios del hospedero, separando la corteza externa, el córtex y el floema, hasta llegar al xilema (De la Paz Pérez *et al.*, 2006).

El género *Cladocolea* comúnmente conocido como muérdago verdadero o injerto, es una planta parásita de árboles que a lo largo de los años ha pasado inadvertido a los arboricultores mexicanos, en comparación con otros muérdagos verdaderos. Se encontró que en nuestro país el género cuenta con al menos 19 especies parasitando latifoliadas principalmente, aunque las coníferas no se escapan, siendo el género *Salix* uno de los más severamente afectados. Se encontró que *Cladocolea* se distribuye en al menos 11 estados de la República Mexicana (Alvarado y Saavedra, 2005).

*Cladocolea loniceroides* fue el primer muérdago introducido accidentalmente, que ha sido documentado para México. *C. loniceroides* ocurre naturalmente en Jalisco, Michoacán, Guerrero, México, Morelos y Oaxaca. En 1971 se observó sobre plantas de trueno *Ligustrum*, en la ciudad de México; se cree que los truenos fueron llevados de un vivero de Cuernavaca, Morelos (Calderón, 1979).

En México, los árboles hospederos del muérdago usualmente son coníferas y otros árboles. Esto afecta en forma directa la producción maderera y frutícola del país por la merma que estas plantas causan en la calidad de la madera o en la pérdida de los individuos. No se conoce con certeza el papel de los muérdagos en el ecosistema, sin embargo sirve como alimento de varias especies de aves que comen sus frutos por lo que es preciso mantener un equilibrio en la población de muérdago en la zona donde aparece para evitar efectos negativos en la alimentación de las aves frugívoras. Estas mismas aves son las que transportan los frutos del

muérdago de un árbol a otro, además remueven el pericarpio del fruto vía regurgitación o defecación y permiten que germinen. Estos frutos segregan sustancias mucilaginosas que permiten su adherencia a los árboles y así proliferar infectando a un nuevo hospedero del que obtiene agua y sales para desarrollarse (López de Buen, 2005).

El muérdago reduce el crecimiento, rendimiento y calidad de árboles madereros e incrementa los costos de operación y protección para la planeación, cosecha, regeneración y mantenimiento integral (Geils y Vázquez, 2002). En la zona chinampera de Xochimilco se observa que altos niveles de daños por *Cladocolea loniceroides* contribuyen en gran medida a la muerte de los árboles o los hace más susceptibles al ataque de otros agentes. La escasa información que existe sobre el género, indica que ha sido poco estudiado en campo, por lo cual, no se conocen varios aspectos de su germinación y su biología (Alvarado y Saavedra, 2005).

Hasta la fecha no existe ningún control químico eficaz para el control del parásito y la única forma de evitarlo es retirando de los árboles las ramas infectadas, de preferencia antes de que aparezca el fruto, pero esto es temporal, ya que el parásito tiende a reaparecer.

El extracto del muérdago *Viscum album* (de origen europeo) ha sido ampliamente usado como terapia complementaria alternativa para el tratamiento de cáncer, para el control de epilepsia, desórdenes nerviosos, delirio, asma, hipertensión, dolor de cabeza y dermatitis en clínicas de países como Alemania, Austria y Suiza (Khawaja, 2009); sin embargo, estos extractos han sido muy criticados por expertos debido a la falta de conocimiento sobre los componentes bioactivos de la planta y su mecanismo de citotoxicidad (Pryme, 2009).

Como anticancerígeno, puede reducir efectos mutagénicos de los radicales libres del oxígeno durante la radio o quimioterapia. Sin embargo, estas propiedades dependen del árbol hospedero del muérdago y de la época de cosecha. (Önay-Uçar *et al.*, 2006, Adedayo y Ganiyu, 2008).

Las viscotoxinas, lectinas y alcaloides del muérdago *Viscum album* son los componentes farmacológicos más relevantes, que presentan el efecto antiproliferativo e inmunomodulador (Urech *et al.*, 2007), de estos componentes, los más importantes son las lectinas. *Viscum album* presenta tres lectinas, llamadas ML-I, ML-II y ML-III, de las cuales, ML-I presenta la

mayor actividad citotóxica, además de un efecto antiproliferativo en células de melanoma (Thies *et al.*, 2005).

La actividad citotóxica se le atribuye principalmente a la fracción proteínica que incluye a las lectinas y viscotoxinas, y en menor grado a alcaloides. Un extracto de muérdago tiene su principal uso en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Khwaja, 1996).

El fruto del muérdago europeo *Viscum album* contiene viscotoxinas de carácter proteico con actividad citotóxica (Tabiasco *et al.*, 2002). Los extractos de muérdago *Viscum album* L. y de la especie *coloratum*, se han usado en terapia contra el cáncer durante más de 80 años en Europa. Los extractos estandarizados se comercializan en algunos países con el nombre de “Iscador”, “Helixor” y “Plenosal”. El tratamiento más común a los pacientes con cáncer es por inyección subcutánea o intravenosa del extracto (Pryme, 2009; Khwaja, 1996).

Khwaja *et al.*, (1996) reportan que extractos acuosos de muérdago europeo y coreano, son útiles para el tratamiento de SIDA, cáncer y otras enfermedades relacionadas al sistema inmunológico suprimido. El extracto de grado farmacéutico contiene niveles específicos de lectinas, viscotoxinas y alcaloides, que en combinación presentan la actividad farmacológica.

La extracción de lectinas y viscotoxinas no es simplemente una extracción acuosa. Luther *et al.* (1979), extrajeron lectinas de *Viscum album* con buffer de fosfatos pH 7, seguido de una cromatografía de afinidad, mientras que Pryme (2009), realizó una cromatografía de intercambio catiónico para la obtención de un preparado de las lectinas ML-I, ML-II y ML-III. Asimismo, Tabiasco *et al.* (2002) purificaron las viscotoxinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Sin embargo, los extractos de *Viscum coloratum* de Khwaja (1996) utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de SIDA, se obtienen con soluciones salinas de cloruro de calcio o de sodio a una concentración de 0.02 M para favorecer la extracción de proteínas.

La zona de Xochimilco fue declarada Patrimonio Cultural de la Humanidad por la UNESCO en 1987 por lo que es una importante zona turística de la Ciudad de México. La vegetación se conforma, principalmente, por ahuejotes, árboles típicos de la región, sembrados en los márgenes de las chinampas. Es importante resaltar que Xochimilco es el único lugar del país en donde se puede apreciar este árbol de singulares características, cuya principal función es

fijar las chinampas al fondo del lago, sin quitar demasiada luz a los cultivos, ya que su ramaje es vertical (GDF, 2009).

## 1.2 Sustancias reactivas de oxígeno (ROS) y enfermedades crónico degenerativas

Las enfermedades crónico degenerativas se han posicionado entre las primeras causas de muerte y su costo en morbilidad y complicaciones es cada vez más alto en nuestro país. Entre las enfermedades crónico degenerativas que contribuyen a aumentar la carga mundial de enfermedad y muerte se encuentran las enfermedades neoplásicas, consideradas como uno de los principales problemas de salud pública. La OMS informa que el cáncer es responsable de aproximadamente 13 a 15% de todas las muertes, siendo superado únicamente por las enfermedades infecciosas y cardiovasculares.

Considerando los dos sexos, el cáncer más frecuente es el de pulmón, seguido del de mama, los colorrectales, estómago, próstata, hígado, cérvix y esófago. El cáncer de mama en términos generales ocupa el segundo lugar de neoplasias en mujeres en países en desarrollo y el primero en naciones con mayor desarrollo socioeconómico. En México ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres: fallecen 10 mujeres y 27 se diagnostican diariamente por esta causa (Morales *et al.*, 2009).

El oxígeno es necesario para la vida, pero si se encuentra en una presión de cinco atmósferas, produce efectos nocivos en el sistema nervioso central y causa rápidamente la muerte. Incluso a presión atmosférica, la inspiración de oxígeno al 100% durante un largo periodo (por arriba de las 48 h), produce estrés respiratorio y, eventualmente, la muerte (Morales *et al.*, 2009).

El oxígeno molecular, también llamado oxígeno triplete, es el que permite la respiración de organismos aerobios aunque también podría ser tóxico. La reactividad de este oxígeno triplete en sistemas biológicos es relativamente baja, pero por activación metabólica muchas sustancias químicas que no son tóxicas en sí, se vuelven tóxicas *in situ* por su transformación metabólica en uno o más intermediarios reactivos con componentes celulares esenciales.

El oxígeno triplete es considerado no tóxico debido a que su reactividad es menor en condiciones fisiológicas, sin embargo, su activación metabólica y su reducción hasta agua se lleva a cabo vía transporte de electrones, lo que forma radicales o especies reactivas moleculares. Estos metabolitos activos del oxígeno pueden ser nucleofílicos, oxidantes o reductores (Roberfroid, 1995).

Esta baja reactividad del oxígeno molecular se debe a que en su configuración electrónica, contiene dos electrones desapareados con espín paralelo, localizados en orbitales diferentes. Como consecuencia, si el  $O_2$  aceptara simultáneamente dos electrones, solo se podrían posicionar en los espines antiparalelos que complementen a los electrones no apareados del  $O_2$ , lo cual es difícil para un par típico de electrones en orbitales atómicos o moleculares que tienen espines opuestos de acuerdo al principio de exclusión de Pauli, de manera que el  $O_2$  acepta solo un electrón a la vez de otros radicales (Beckman y Ames, 1998).

En la Figura 1 se muestra la reducción del oxígeno hasta agua por la adición de electrones y la formación de sustancias reactivas del oxígeno.

Estas especies reactivas del oxígeno (ROS) formadas por la adición de electrones uno a uno, están involucradas en el desarrollo de varios padecimientos y en la aceleración del envejecimiento causadas por el estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2004). El estrés oxidativo es un factor que contribuye de manera importante en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, padecimientos cardíacos o cerebrales. Se genera por un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes de defensa por lo que se generan daños oxidativos. Esto se puede dar por una deficiencia en los mecanismos de defensa de antioxidantes o por el incremento de ROS, por la exposición a elevadas concentraciones de ROS, una activación excesiva de ROS o por la presencia de toxinas metabolizadas por ROS, esto mediado por infecciones o inflamaciones crónicas (Wolfe y Hai, 2007).

El consumo de antioxidantes exógenos en la dieta puede incrementar la protección del cuerpo y ayudar a combatir enfermedades cardíacas y cáncer (Wolfe y Hai, 2007).

La oxidación de sustratos ricos en carbono e hidrógeno para obtener energía química y térmica esenciales para la vida produce intermediarios, dos de los cuales son radicales libres (Gutteridge, 1995).

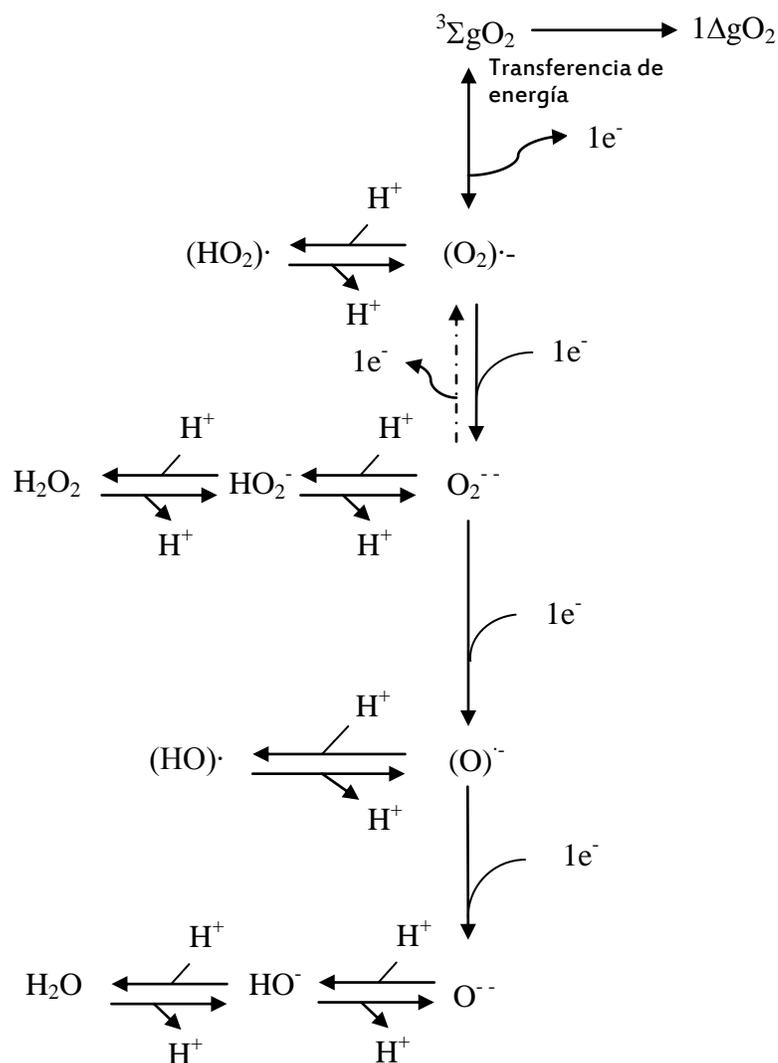


Figura 1. Formación de especies reactivas del oxígeno por adición de electrones durante la reducción del oxígeno triplete hasta agua (Roberfroid, 1995).

Un radical libre es cualquier átomo o grupo que posee uno o más electrones desapareados por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren los sistemas vivos, intentando tomar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical ha conseguido el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede

se convierte a su vez en otro radical, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que sirve para sintetizar compuestos, transformarlos o destruir células (Morales *et al.*, 2009).

La vida media de un radical libre es de microsegundos pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares, cuando interaccionan con ellos provocando su peroxidación. Esta peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades (Morales *et al.*, 2009).

Los radicales libres no son solo entidades químicas dañinas. El organismo humano los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Los radicales producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones son neutralizados fácilmente por el propio sistema. El cuerpo produce unas enzimas (catalasa y superóxido dismutasa) que son las encargadas de neutralizarlos. Estas enzimas tienen la capacidad de neutralizar a los radicales libres sin desestabilizar su propio estado (Morales *et al.*, 2009).

Los radicales libres y los oxidantes son generados en diversos procesos biológicos, que incluyen la fosforilación oxidativa, la fagocitosis, el metabolismo de ácidos grasos y la síntesis y degradación de las biomoléculas. El equilibrio entre oxidantes y antioxidantes regula procesos vitales que incluyen a la proliferación celular y a la apoptosis. Pero las reacciones de las especies reactivas del oxígeno con lípidos, proteínas y ADN, producen daño potencialmente peligroso. En particular, el daño oxidativo al ADN probablemente contribuye al envejecimiento y a la carcinogénesis (Morales *et al.*, 2009).

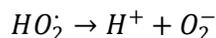
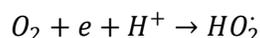
Otra fuente potencial de la generación de especies reactivas de oxígeno son las células fagocíticas, tales como los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, las cuales utilizan el sistema enzimático de la NADPH oxidasa para generar el  $O_2^{\cdot-}$  contra la invasión de microorganismos. La fagocitosis de bacterias o virus por los leucocitos se asocia con un aumento en el consumo de oxígeno, un mayor flujo de la glucosa a través de la vía del fosfogluconato, que produce niveles altos de NADPH y, la producción de  $O_2^{\cdot-}$  a partir de oxígeno, debido a la acción de la NADPH oxidasa, que se encuentra en la superficie externa de la membrana plasmática de los leucocitos y que con el concurso de mieloperoxidasa, en presencia de iones cloruro, forma el hipoclorito, sustancia altamente oxidante, que desempeña

una función microbicida, pero que, sin embargo, la producción de un exceso de esta sustancia, provoca estrés oxidativo en los individuos (Morales *et al.*, 2009).

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo, por medio de reacciones bioquímicas de óxido-reducción, generalmente a partir de oxígeno. Dichas reacciones se conocen como redox y se dan por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria y están asociados con la generación de especies reactivas de oxígeno, que generalmente son tóxicas y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estas moléculas o átomos reactivos, se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades como algunos tipos de cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas y afecciones broncopulmonares; así como en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. También están implicadas en procesos fisiológicos como en el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros. Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados o especies de nitrógeno reactivas cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos tiempos (Morales *et al.*, 2009).

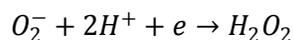
Las principales especies reactivas del oxígeno son las siguientes:

- Radical anión superóxido



Es formado cuando un electrón entra en un orbital  $\pi$  del oxígeno triplete, en solución acuosa el radical superóxido es débil oxidante (Gutteridge, 1995).

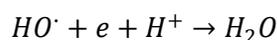
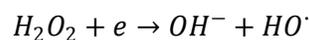
- Peróxido de hidrógeno





Se produce como resultado de la dismutación del radical anión superóxido o por la adición directa de dos electrones al oxígeno molecular mediada por enzimas. Este es un oxidante débil y débil reductor ya que es relativamente estable en ausencia de iones de metales de transición, debido a que tiene todos sus electrones apareados. Sin embargo las propiedades redox de esta sustancia tienen la habilidad de formar radicales libres altamente reactivos en presencia de iones de metales de transición (Gutteridge, 1995).

- Radical hidroxilo



Es un oxidante extremadamente agresivo que ataca a la mayoría de las moléculas biológicas, puede atacar ácidos grasos poliinsaturados para iniciar la peroxidación lipídica y es el radical más producido por el organismo (Gutteridge, 1995).

- Oxígeno singulete ( $^1O_2$ )

Es una forma altamente reactiva del oxígeno en la que por excitación de los electrones desapareados del  $O_2$ , uno de ellos cambia su giro y se aparea con el otro electrón, por lo que se eliminan los espines paralelos no apareados del oxígeno, incrementando su capacidad oxidante (Gutteridge, 1995).

- Ozono ( $O_3$ )

Al nivel de la estratósfera es un gas azul pálido muy importante como protector de la radiación solar, pero a nivel de suelo, es tóxico, contaminante y oxidante, producido por contaminación del aire. No es radical libre, sin embargo produce una cascada de reacciones de radicales libres derivados de los productos de ozonización por lo que es extremadamente dañino para pulmones, oxida proteínas, ADN y lípidos (Gutteridge, 1995).

- Óxidos de nitrógeno



Óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\cdot$ ) contienen un número impar de electrones y por eso son radicales libres que los convierte en potentes agentes oxidantes (Gutteridge, 1995).

### 1.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias sintéticas o naturales que presentes en bajas concentraciones comparadas con las biomoléculas que deben proteger, previenen la oxidación o inhiben reacciones promovidas por oxígeno y peróxidos. Muchas de estas sustancias son utilizadas como conservadores de varios productos para evitar su deterioro (Huang *et al.*, 2005).

Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo y las relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química. Ejercen sus propiedades protectoras previniendo la producción de radicales libres o neutralizando los producidos en el cuerpo (Morales *et al.*, 2009).

Se conocen tres tipos principales de antioxidantes:

- Primarios. Previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.
- Secundarios. Capturan los radicales libres, evitando la reacción en cadena
- Terciarios. Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres (Morales *et al.*, 2009).

También se maneja la clasificación basada según su origen y por sus características bioquímicas. La clasificación se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación bioquímica de los antioxidantes.

<b>Origen</b>	<b>Tipo</b>	<b>Acción</b>
<b>Exógenos</b>  <b>Vitamina E</b> <b>Vitamina C</b> <b>β-carotenos</b> <b>Flavonoides,</b> <b>licopenos</b>	Secundarios	Neutraliza el oxígeno singulete Captura radicales libres hidroxilo Neutraliza peróxidos Captura O <sub>2</sub>
<b>Endógenos</b> <b>enzimáticos</b> <b>Superóxido</b> <b>dismutasa (SOD)</b> <b>Catalasa (Cat)</b> <b>Glutación</b> <b>peroxidasa (GPx)</b>	Primario	Regenera la forma oxidada de la vitamina E Neutraliza el oxígeno singulete
<b>Endógenos no</b> <b>enzimáticos</b> <b>Glutación</b> <b>Coenzima Q</b> <b>Ácido tioctico</b>	Primarios o secundarios	Cofactor Cobre, sodio, manganeso, hierro, selenio Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células. Transportadores de materiales (transferrina y ceruplasmina)

(Morales *et al.*, 2009).

Un gran número de plantas aromáticas y medicinales contienen compuestos químicos con propiedades antioxidantes. El descubrimiento de estas propiedades resultan interesantes y útiles particularmente como nuevas fuentes de antioxidantes naturales, alimentos funcionales y nutraceuticos (Miliauskas *et al.*, 2004).

Algunos alimentos contienen compuestos fenólicos que generalmente tienen elevada actividad antioxidante, lo que significa que tiene efectos positivos en la preservación de la calidad de alimentos y de la salud humana, por lo que generalmente se incluyen en la dieta (Becker *et al.*, 2004). El uso de antioxidantes naturales, como aditivos alimentarios para la inactivación de radicales libres capta la atención de muchos hoy en día, no solo por las propiedades reductoras, sino porque son naturales y el consumidor los aprecia (Miliauskas *et al.*, 2004).

Un perfil de la composición química de la planta junto con el conocimiento de su actividad antioxidante puede proporcionar una estimación de su potencial terapéutico (Akinmoladun *et al.*, 2007).

Los compuestos fenólicos constituyen un extenso grupo de compuestos, generalmente encontrados en plantas, que contienen grupos hidroxilo unidos a anillos fenólicos que le confieren su actividad antioxidante. Las propiedades químicas de los polifenoles en términos de disponibilidad de hidrógenos son como donadores de los mismos o como atrapadores de radicales, lo que confiere su actividad antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Para que un polifenol pueda ser definido como antioxidante, debe satisfacer dos condiciones: primero, cuando esté presente en bajas concentraciones relativas al sustrato a oxidar, debe detener, retardar o prevenir la autooxidación o ser mediador de la oxidación causada por radicales libres. Segundo, el radical formado como resultado debe ser estable y no participar en las reacciones en cadena de oxidación (Rice-Evans *et al.*, 1996).

#### **1.4 Actividad antioxidante**

Por definición la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de inhibir la degradación oxidativa (Roginsky y Lissi, 2005).

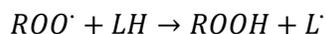
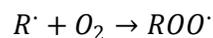
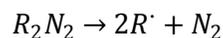
Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* muestran tan solo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski *et al.*, 2005).

La medición de la actividad antioxidante en un ensayo individual, refleja solo la reactividad química bajo ciertas condiciones de la prueba, por lo que es inapropiado generalizar los datos de un método de medición en particular, como indicador de actividad antioxidante total (Huang *et al.*, 2005).

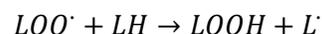
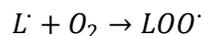
La cinética de la autooxidación y su inhibición, en general se puede presentar como en la Figura 2.

La prevención de la oxidación primaria es la clave de la función de los antioxidantes (Huang *et al.*, 2005).

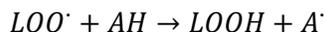
Inicio



Propagación



Inhibición



Terminación



Donde,  $R_2N_2$  es un compuesto azo, LH es el sustrato y AH es el antioxidante.

Figura 2. Cinética de autooxidación e inhibición de la misma. Formación de radicales libres y acción de antioxidantes (Huang *et al.*, 2005).

## 1.5 Métodos de cuantificación de la capacidad antioxidante

### 1.5.1 Métodos *in vitro*

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se pueden dividir en dos grandes categorías, los basados en la reacción de transferencia de átomo hidrógeno (HAT) y los basados en las reacciones de transferencia de un solo electrón (ET). Los últimos involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del final de la reacción, mientras que los

métodos HAT, generalmente usan un compuesto generador de radicales libres, un indicador molecular oxidable y un antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

- Método de inhibición de consumo de oxígeno (IOU).

Este método usa como sustrato estireno y como radical iniciador azoisobutironitrilo. Se mide el consumo de oxígeno en presencia o ausencia de tocoferoles en clorobenceno usando un sistema transductor de presión bajo una atmósfera de presión de oxígeno. Este método no tiene una aplicación amplia debido a que las condiciones de trabajo de presión de oxígeno son irreales y las muestras de alimentos tienen baja concentración de antioxidantes por lo que la sensibilidad del método no es suficiente (Huang *et al.*, 2005).

- Inhibición de autoxidación lipídica.

Este método induce artificialmente la autoxidación de ácido linoleico por Cu (II) o un iniciador azo. El progreso de la autoxidación es monitoreado por absorbencia UV a 234 nm, para detectar peróxidos conjugados de dieno. Este método es más sensible que el método de inhibición de consumo de oxígeno, sin embargo, muchos compuestos orgánicos de alimentos absorben a 234 nm por lo que no es una medición exacta (Huang *et al.*, 2005).

- Capacidad de absorbencia del radical oxígeno (ORAC).

Originalmente, la primera versión del ORAC usaba la proteína fluorescente B-Ficoeritrina (B-PE) como prueba. Su fluorescencia decaía como indicador del daño producido por la reacción con radical peroxilo. Sin embargo, se encontró que la B-PE representaba grandes desventajas para la medición de capacidad antioxidante, ya que tiene gran variabilidad, es fotosensible e interacciona con polifenoles de manera inespecífica perdiendo fluorescencia aun sin agregar el radical generador. Para resolver este problema, se reemplazó la B-PE con fluoresceína que es sintética y cubre las limitaciones de B-PE. La prueba ORAC provee una medición directa de la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica contra radicales peroxilo (Huang *et al.*, 2005).

La muestra, el control y el estándar son mezclados con fluoresceína y es incubada a temperatura constante (37°C) antes de iniciar la reacción con el radical iniciador azo. La intensidad de la fluoresceína es monitoreada cada minuto por 35 min a condiciones ambientales (37°C, pH 7.4). Conforme avanza la reacción, la fluoresceína es consumida y su

intensidad decrece. En presencia del antioxidante el decremento de fluoresceína es inhibido. Este método se ha utilizado ampliamente para cuantificar la capacidad antioxidante en alimentos (Huang *et al.*, 2005).

- Método de blanqueamiento de Crocina.

Este método mide la capacidad de protección de los antioxidantes frente a un generador de radicales libres en el blanqueamiento de crocina que es un derivado carotenoide.

El progreso de la reacción es monitoreado por espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 443 nm, durante 10 min.

El método de blanqueamiento de crocina tiene limitaciones en alimentos ya que varían las constantes de reacción entre  $ROO^{\bullet}$  y fitoquímicos, muchos pigmentos de alimentos absorben a la misma longitud de onda y la crocina al ser una mezcla natural de pigmentos extraídos del azafrán tiene mucha variabilidad (Huang *et al.*, 2005).

- Parámetro total del atrapamiento de radicales por antioxidantes.

Este parámetro usa R-ficoeritrina como muestra fluorescente. El progreso de la reacción con iniciador azo es monitoreado fluorométricamente ( $\lambda_{ex} = 495$  nm y  $\lambda_{em} = 575$  nm). La capacidad antioxidante es expresada en equivalentes Trolox (Huang *et al.*, 2005).

- Fenoles totales por reactivo Folin-Ciocalteu.

Mide la capacidad de reducción de una muestra. El reactivo de Folin-Ciocalteu es color amarillo, la contaminación con reductores le da un color verde, mientras que los oxidantes le regresan su color amarillo. El reactivo no es específico a compuestos fenólicos, por lo que puede ser reducido por compuestos no fenólicos. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo solo bajo condiciones alcalinas. La disociación de protones fenólicos genera un anión fenolato que es capaz de reducir al reactivo (Huang *et al.*, 2005).

- Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC)

El oxidante  $ABTS^{\bullet+}$  es generado por oxidación de  $ABTS^{2-}$  con persulfato. Al mezclar el reactivo con la muestra, la absorbencia es leída a 30°C a los 1,4 y 6 min. La diferencia de la

absorbencia leída es graficada contra la concentración de antioxidantes dando una línea recta. La concentración de antioxidantes que muestra el mismo porcentaje de cambio en la absorbencia de ABTS<sup>•+</sup> de 1 mM de Trolox se considera como TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) (Huang *et al.*, 2005).

Debido a su simplicidad, el método TEAC ha sido usado en laboratorios de investigación para estudiar la capacidad antioxidante y se han reportado valores de capacidad antioxidante en alimentos (Huang *et al.*, 2005).

- Poder reductor

El hexacianoferrato de potasio, con Fe<sup>+3</sup> se reduce en presencia de antioxidantes a Fe<sup>+2</sup> formando un complejo KFe<sup>III</sup>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>] de color azul que absorbe a una longitud de onda de 700nm (Yen y Chen, 1995)

- Potencial antioxidante total usando Cu(II)

El método se basa en la reducción de Cu(II) a Cu(I) por acción de antioxidantes presentes en la muestra. Un reactivo cromógeno, bathocuproína, forma una complejo 2:1 con Cu(I), que tiene un máximo de absorbencia a 490 nm (Huang *et al.*, 2005).

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

La solución de DPPH<sup>•</sup> en metanol es mezclada con la muestra en solución. El progreso de la reacción es monitoreada a 515nm por 45 min o hasta que la absorbencia es estable. Al completarse la reducción el color de la solución desaparece. Se calcula el porcentaje de inhibición. Un inconveniente de este método es que muchos antioxidantes que reaccionan con radicales peroxilo, pueden reaccionar muy lentamente o ser inertes al DPPH<sup>•</sup> (Huang *et al.*, 2005).

- Sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta difícil determinar la magnitud de esta peroxidación. Sin embargo, es más accesible determinar los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta

capacidad reactiva, siendo el más significativo el malondialdehído (MDA) (Kamal y Pokorný, 2005).

Este método se basa en determinar el daño oxidativo de los lípidos mediante la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar compuestos cromógenos de MDA-TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible a una longitud de onda de 532 nm o por fluorimetría a 532 nm de excitación y 553 de emisión (Kamal y Pokorný, 2005).

El MDA, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, da lugar a una reacción de condensación entre dos moléculas de TBA con una de malondialdehído en la que se produce un compuesto cromógeno de color rojo que es detectable por espectrofotometría (Kamal y Pokorný, 2005).

### 1.5.1 Métodos *in vivo*

Las técnicas *ex vivo* están tomando importancia como alternativas a las pruebas de toxicidad animal, ya que disminuye el uso de animales experimentales y el costo, además tienen gran especificidad y rapidez (Asensio *et al.*, 2007).

- Evaluación de efecto citotóxico.

Los ensayos de citotoxicidad miden las alteraciones inducidas por drogas en rutas metabólicas o integridad estructural, la cual puede o no ser relacionada directamente a la muerte celular, sin embargo, los ensayos de supervivencia miden el final de los resultados de tales perturbaciones metabólicas los cuales pueden ser tanto recuperación celular o muerte celular. Teóricamente el único índice de supervivencia en la proliferación celular es la demostración de la integridad reproductiva (Freshney, 1992).

La citotoxicidad es una interpretación instantánea de la muerte celular. La viabilidad intenta predecir la velocidad de supervivencia midiéndola directamente, esta técnica es buena para determinar células muertas pero podría sobreestimar la supervivencia. La citotoxicidad implica

---

un rompimiento en la integridad de la membrana y la muerte irreversible celular (Freshney, 1992).

- Absorción de rojo neutro (NRU).

Este método es utilizado para probar nuevos productos terapéuticos para padecimientos agudos y para evaluación de toxicidad crónica (Ndhlala, 2010).

El método de absorción de rojo neutro evalúa células viables o sobrevivientes basadas en la capacidad que tienen para incorporar o unir rojo neutro, una tinta supravital. El rojo neutro es una tinta catiónica débil que penetra la membrana celular por difusión y se acumula intracelularmente en los lisosomas. Las alteraciones en las membranas lisosomales provocan fragilidad y otros daños irreversibles. Estos daños reducen la absorción de rojo neutro, es por esto que es posible distinguir entre células viables, dañadas o muertas (Repetto *et al.*, 2008).

- Evaluación de oxidación de lípidos *in vivo*.

Las especies reactivas del oxígeno son mediadores importantes del daño celular alterando membranas o actividad enzimática. Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles al ataque de radicales libres, formándose hidroperóxidos lipídicos, hidróxidos y aldehídos como productos de la degradación (El Haffidi y Baños, 1997).

El Fe(III) y Fe(II) catalizan reacciones de peroxidación lipídica por la generación de especies reactivas del oxígeno, por lo que en este análisis, se induce peroxidación lipídica por inyección intraperitoneal de hierro-dextan *in vivo* a ratas. La peroxidación se evalúa por el método de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en suero sanguíneo (El Haffidi y Baños, 1997).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Xochimilco, como patrimonio de la humanidad desde la declaración por la UNESCO en 1987, debe conservar sus características particulares de paisaje y cultivos heredados desde épocas precolombinas. El paisaje se mantiene gracias a los ahuejotes (*Salix bonplandiana*) que sostienen con sus raíces a las chinampas, lo que les da estabilidad para el cultivo de hortalizas y flores de la zona (GDF, 2009). Por lo tanto es necesaria la conservación de las chinampas y de esta manera se podría asegurar una de las principales actividades económicas de sus habitantes que es el turismo.

Xochimilco se enfrenta a diversos problemas, entre ellos, la contaminación. Uno de estos problemas es el reciente incremento en la infestación por muérdago principalmente de los ahuejotes y arbustos de la región. Esta es una planta parásita que no solo está terminando con las áreas verdes de Xochimilco, sino que también la plaga se ha extendido a toda la Ciudad de México. Por lo tanto, en un futuro cercano se piensa que esta infestación repercutirá en la calidad del aire que respiramos, por lo que es necesario que se realicen estudios para un mejor conocimiento de esta planta de tal manera que se controle su desarrollo para conservar en buen estado los árboles de nuestro entorno y de manera importante en la zona chinampera de Xochimilco.

El muérdago podría ser fuente de compuestos antioxidantes naturales, que en la actualidad son apreciados por su actividad biológica, para el tratamiento y prevención de ciertas enfermedades crónico degenerativas. Se ha reportado que en otros géneros de muérdago particularmente en *Viscum album* de origen europeo y coreano, existen proteínas capaces de coadyuvar en el tratamiento postoperatorio de cáncer, sin embargo no se sabe nada de estas propiedades en los géneros mexicanos.

El muérdago que es la plaga que contamina al ahuejote, podría tener utilidad por las posibles propiedades farmacológicas que pudiera contener. De existir, se podría contribuir al control de la infestación por este parásito y de esta manera disminuir la contaminación ambiental en la zona. Los residuos de muérdago se procesarían para obtener productos con actividad biológica. Por lo anterior es necesario realizar un estudio para el aprovechamiento de los compuestos antioxidantes que se encuentran en esta planta, aumentando su conocimiento



científico y dándole un valor agregado, logrando a su vez alternativas de aprovechamiento que contribuyan a la conservación de Xochimilco como Patrimonio de la Humanidad.



### 3. HIPÓTESIS

Extractos de muérdago de *Cladocolea loniceroides* pueden mostrar actividad antioxidante *in vitro* capaz de inhibir la lipoperoxidación *in vivo* y de alguna manera puede inhibir el desarrollo de un cultivo de células de cáncer.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extractos de hojas, de frutos y de tallo del muérdago recolectado en la zona chinampera de Xochimilco, para darle un valor agregado, así como contribuir al conocimiento científico de esta planta.

#### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1.1. Comparar el rendimiento de extracción de la fracción antioxidante de hojas, frutos y tallos del muérdago por extracción con disolventes y por saponificación.
- 5.1.2. Evaluar el comportamiento de la capacidad antioxidante de los extractos de muérdago en diferentes sistemas de óxido-reducción.
- 5.1.3. Evaluar la actividad biológica de un extracto acuoso de polifenoles en ratas con lipoperoxidación inducida y en cultivos de células de cáncer de mama.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 5 se muestra un esquema de la estrategia experimental que se siguió para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de los extractos de muérdago *Cladocolea loniceroides*, así como la evaluación citotóxica.

### 5.1 Recolección de muérdago

Se recolectó muérdago parásito fructificado de *Salix bonplandiana* (ahuejote) del embarcadero “Nuevo Nativitas”, Xochimilco, en el mes de febrero de 2009. En la Figura 3 se aprecia al ahuejote infestado de muérdago. El color característico del estado maduro del fruto de *Cladocolea loniceroides* se observa en detalle en la Figura 4.

Se lavó, desinfectó y se secaron hojas, frutos y tallos por separado a temperatura ambiente. Posteriormente se molió haciéndolo pasar por un tamiz para obtener partículas de 420  $\mu\text{m}$ .



Figura 3. Árbol infestado con *Cladocolea loniceroides*.



Figura 4. Detalle de *Cladocolea loniceroides*.

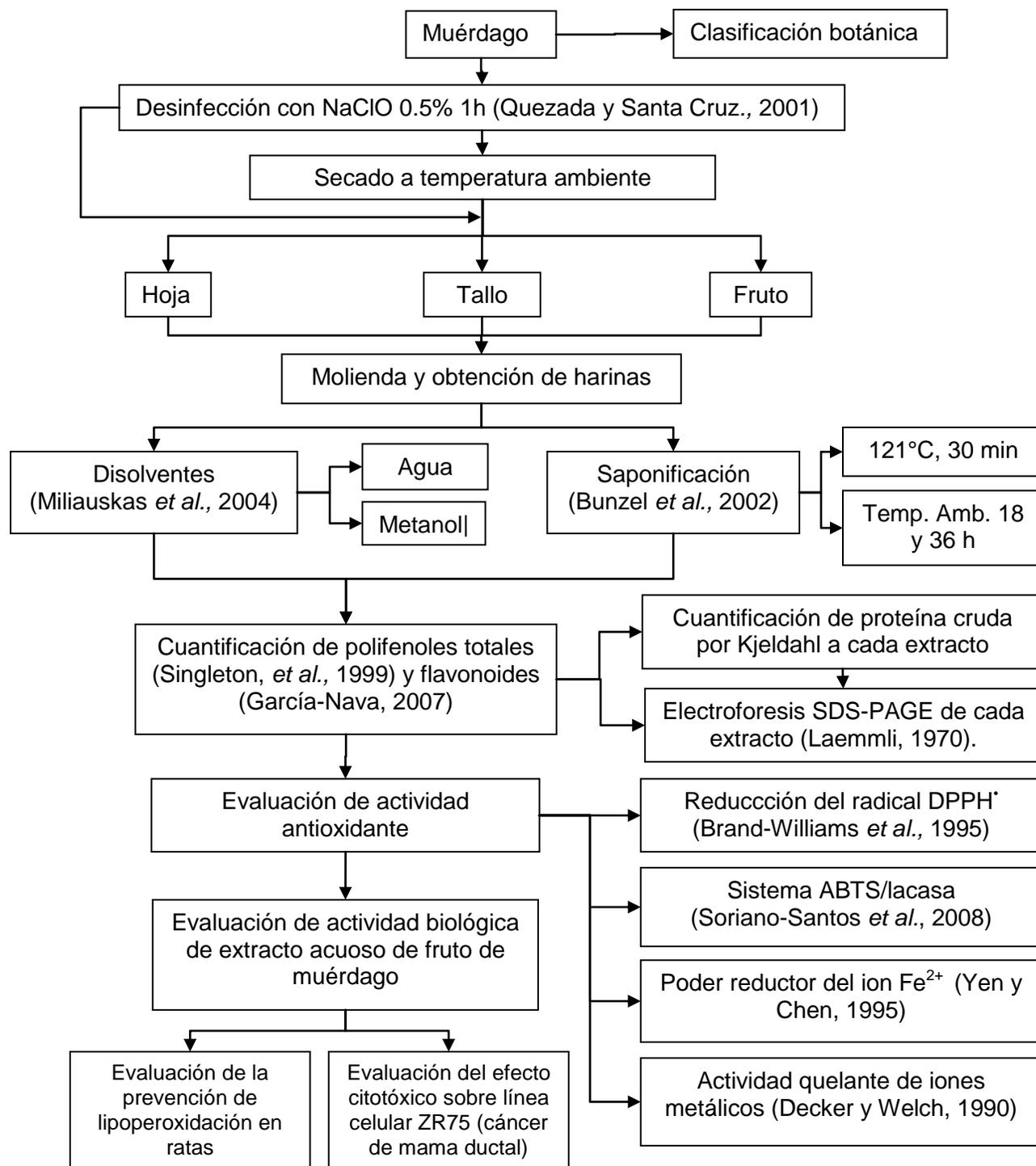


Figura 5. Estrategia experimental para la evaluación de la actividad antioxidante del muérdago *Cladoclea loniceroides*

Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia  $p < 0.05$  para determinar el solvente y tiempo de extracción más eficiente para cada muestra analizada.

Posteriormente la determinación de la capacidad antioxidante se realizó a 9 muestras que presentaron la mayor concentración de polifenoles totales. Cada análisis se realizó por triplicado.

## 5.2 Análisis químico proximal

Se realizó el análisis químico proximal o bromatológico de cada una de las estructuras del muérdago que se estudiaron. Las metodologías utilizadas fueron las oficiales de la AOAC, 2000:

- Humedad: Método de secado en horno, no. 14004 (AOAC, 2000). En este método la muestra es calentada bajo condiciones específicas y la pérdida de peso de la muestra se utiliza para calcular el contenido de humedad de la misma.

Se llevó a peso constante un pesa filtro manteniéndolo a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 3 h. Una vez a peso constante se colocaron 2 g de muestra en el pesa filtro y se llevó a la estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 2 h, se sacó y se dejó enfriar en desecador para tomar el peso. Posteriormente se introdujo de nuevo a la estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  por 30 min, se dejó enfriar y se pesó, hasta llegar a peso constante.

El contenido de humedad fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = m - \frac{W_{\text{final}} - W_{\text{inicial}}}{m} \times 100$$

Donde:

$W_{\text{final}}$ : peso del pesa filtro con muestra seca

$W_{\text{inicial}}$ : peso del pesa filtro vacío

m: peso de la muestra

- Cenizas: Método por incineración, no. 14006 (AOAC, 2000). El contenido de cenizas es el residuo inorgánico obtenido de la incineración de la muestra a altas temperaturas. Se puso un crisol a peso constante durante 2 h en mufla a 600°C y se colocaron 2 g de muestra. Primeramente se calcinó la muestra en campana de extracción sobre la flama de un mechero hasta que no hubo desprendimiento de humo. Posteriormente se introdujo el crisol en la mufla a 600°C hasta que las cenizas fueron blancas. El porcentaje de cenizas, fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{W_{\text{final}} - W_{\text{inicial}}}{W_{\text{muestra}}} \times 100$$

Donde:

$W_{\text{final}}$ : peso del crisol con la muestra calcinada

$W_{\text{inicial}}$ : peso del crisol vacío

$W_{\text{muestra}}$ : peso de la muestra utilizada

- Nitrógeno total y proteína cruda: Método Kjeldahl, no. 2.049 (AOAC, 2000). El nitrógeno es el elemento químico que permite diferenciar a las proteínas de grasas y carbohidratos, sin embargo, la fracción proteica de una muestra no es la única fuente de nitrógeno, ya que puede venir de péptidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados no proteicos. El contenido de nitrógeno en una muestra, es convertido en sales de amonio por digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. Se colocaron 0.15 g de muestra con 0.8 g de catalizador ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$  (1:9)) y 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en un matraz Kjeldahl. Se realizó la digestión de la muestra hasta no desprender humo bajo una campana de extracción. Una vez terminada la digestión, se transfirió la muestra a un destilador microkjeldahl con 5 mL de agua, posteriormente se agregaron 15 mL de NaOH al 40% y para recibir la destilación se colocó un vaso con 10 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 2% con 3 gotas de rojo de metilo y azul de metileno como indicadores. Terminada la destilación, se tituló la muestra con HCl 0.1 N. El contenido de nitrógeno en la muestra se obtuvo por la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(mL \text{ de HCl gastados en la muestra})}{W} \times meq N \times N_{HCl} \times 100$$

Y el contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno por el factor 6.25:

$$\% \text{ proteína} = \%N \times 6.25$$

Donde:

meq N: miliequivalentes de nitrógeno

$N_{HCl}$ : normalidad del ácido clorhídrico

%N: porcentaje de nitrógeno

W: peso de la muestra

- Extracto etéreo: Método Soxhlet, no. 7.056 (AOAC, 2000). El contenido de lípidos puede determinarse por extracción con una fracción de éter etílico en un aparato de extracción continua por reflujo con exceso de disolvente.

Primeramente se puso a peso constante un matraz de bola con 3 perlas de vidrio. En un cartucho de celulosa se colocaron 2 g de muestra con tapón de algodón y se colocó el cartucho en el extractor. En el matraz de bola se colocaron 80 mL de éter etílico (equivalente a 2 cargas). Se ensambló el equipo con refrigerante y se colocó una parrilla con temperatura controlada de 70°C. Se completó la extracción después de 3 descargas de solvente.

Posteriormente se recuperó el solvente hasta que el contenido del matraz quedó seco y se llevó el matraz con la fracción grasa a la estufa hasta llegar a peso constante. El porcentaje de extracto etéreo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{\text{Matraz con grasa} - \text{matraz a peso constante}}{W \text{ muestra}} \times 100$$

- Fibra cruda: Hidrólisis ácida y alcalina, no. 7.054 (AOAC, 2000). La determinación de material orgánico que no es solubilizado con ácido o álcali diluido, es celulosa y lignina, que es conocido como fibra cruda y da idea de digestibilidad de la muestra.

Se colocó en un vaso Berzelius de 600 mL, 2 g de muestra desengrasada con 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.255 N y se calentó en condensador hasta ebullición durante 30 min. Se filtró en gasa y se lavó la muestra con agua caliente.

Después se transfirió el residuo de nuevo al vaso y se digirió con 200 mL de NaOH 0.313 N y se dejó hervir durante 30 min en el condensador. Se filtró con papel filtro Whatman No. 4 y se adicionaron 25 mL de ácido, seguido de 3 lavados con agua y un lavado final con 25 mL de alcohol al 95%. Se secó durante 2 h a 130°C, se dejó enfriar en desecador y se pesó. Por último, se calcinó la muestra a 600°C por 30 min, se dejó enfriar y se pesó de nuevo.

La cantidad de fibra cruda se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{\text{crisol sin calcinar} - \text{crisol calcinado}}{\text{muestra desengrasada}} \times \frac{\text{g muestra sin grasa}}{100 \text{g muestra intacta}} \times 100$$

Donde los gramos de muestra sin grasa, dependen del contenido de grasa en 100 g de muestra.

### 5.3 Determinación de proteína verdadera

Se cuantificó el contenido de proteína verdadera por el método de Bradford (1976). El fundamento de este método se basa en que el azul de Coomassie del reactivo de Bradford se une a los residuos básicos y aromáticos de los residuos de aminoácidos, especialmente arginina. El azul de Coomasie tiene un máximo de absorbencia entre 465 y 595 nm cuando ocurre el enlace a proteína.

En el método estándar, se mezclan 100 µL de la muestra o solución estándar con 5 mL del reactivo de Bradford, se agita vigorosamente y tras un reposo de 5 min, se lee la absorbencia a una longitud de onda de 595 nm.

## 5.4 Electroforesis

A cada uno de los extractos obtenidos se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las soluciones stock para la preparación de los geles se muestran en la Tabla 2.

La composición de los geles se muestra en la Tabla 3. Cada muestra se diluyó 1:1 en búfer de muestra (Tabla 4) y se aplicaron 15  $\mu$ L de cada una de las muestras en cada pozo del gel.

El marcador utilizado fue SigmaMarker™ con un rango de peso molecular de 6,500 a 66,000 Da. Las bandas reveladas para el marcador obtenidas por tinción con azul de Coomassie, son las de la Figura 6:

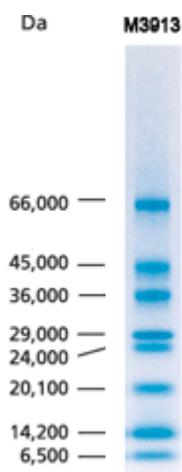


Figura 6. Pesos moleculares del marcador SigmaMarker™

Las bandas corresponden a:

- Albúmina sérica bovina (66 kDa)
- Ovoalbúmina (45 kDa)
- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa)
- Anhidrasa carbónica (29 kDa)
- Tripsinógeno (24 kDa)
- Inhibidor de Tripsina (20 kDa)
- $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa)

- Aprotinina (6.5 kDa)

La corrida se llevó a cabo a 120 V constantes durante 90 min a temperatura ambiente y se revelaron las bandas por tinción con plata.

Tabla 2. Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE

<b>Solución</b>	<b>Tris (M)</b>	<b>Glicina (g/L)</b>	<b>pH</b>	<b>SDS (%)</b>
0.5M Tris-HCl	0.5	-	6.8 <sup>c</sup>	-
1.5M Tris-HCl	1.5	-	8.8 <sup>c</sup>	-
Buffer de corrida	15 (g/L)	72	8.3	0.5
SDS	-	-	-	10
<b>Mezcla de acrilamida-bisacrilamida</b>	<b>% acrilamida (p/v)</b>	<b>% bisacrilamida (p/v)</b>		
30% T <sup>a</sup> . 2.67%C <sup>b</sup>	29.2	0.8		

- % concentración de acrilamida y bisacrilamida
- % concentración de entrecruzamiento de acrilamida-bisacrilamida
- ajustar el pH con HCl concentrado

Tabla 3. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE

<b>Solución o reactivo</b>	<b>Gel concentrador (4%)</b>	<b>Gel de separación (12%)</b>
Agua desionizada	6.1 mL	3.5 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Solución de acrilamida-bisacrilamida (30% T, 2.67% C)	1.3 mL	4.0 mL
Desgasificar al vacío	20 min	20 min
Persulfato de amonio (10%) <sup>a</sup>	100 µL	100 µL
TEMED	15 µL	10 µL

- Preparar el mismo día.

Tabla 4. Composición del buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1
Glicerol	0.8
SDS 10%	1.6
2- $\beta$ -mercaptoetanol	0.4
Azul de bromofenol 0.05% (p/v)	0.2

### 5.5 Extracción de polifenoles totales

La extracción de la fracción de polifenoles totales de cada muestra se llevó a cabo por diferentes métodos:

- Extracción con solventes. Se utilizaron 2 disolventes: agua y metanol, de acuerdo a la metodología propuesta por Miliauskas *et al* (2004). La extracción se llevó a cabo en dos pasos. Se tomaron 0.5 g de muestra seca con 10 mL de solvente y se mantuvo en agitación durante 30 min y otra muestra con 1 h de agitación. Concluido este tiempo, se centrifugó la muestra para separar el solvente del sólido y se adicionaron de nuevo 10 mL de metanol o de agua a los sólidos y se mantuvieron en agitación 30 min o 1 h respectivamente. Se combinaron los extractos para la cuantificación de polifenoles totales.
- Para otra extracción con agua, se calentaron 25 mL de agua hasta ebullición y se agregaron 0.5 g de muestra, dejando ebullicir durante 5 min. Para separar los sólidos, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 3 min.
- Extracción por saponificación. Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Soriano-Santos *et al.*, (2008) tomándose 0.5 g de muestra con 15 mL de NaOH 4 M en frasco de vidrio de 1 L con tapa de plástico. Se llevó a 121°C en autoclave durante 30 min. Posteriormente, las muestras se acidificaron hasta un pH cercano a 5 con HCl concentrado y se extrajo la fracción antioxidante con 15 mL de acetato de etilo 3 veces de 5 mL cada una. Los extractos fueron combinados y evaporados a sequedad. Por

último la muestra se redisolvió en metanol aforando a 10 mL. De aquí se tomó la muestra para las determinaciones de polifenoles y actividad antioxidante.

## 5.6 Cuantificación de polifenoles totales

Este método mide el contenido total de polifenoles. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de molibdato de sodio (25 g), tungstato de sodio (100 g), ácido clorhídrico concentrado (100 mL), ácido fosfórico al 85% (50 mL) y agua (700 mL). Esta mezcla debe ebulir por 10 h. Después de esto se agrega sulfato de sodio (150 g) dando como resultado una solución de color amarillo intenso. La contaminación de este reactivo con reductores le confiere color verde.

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo bajo condiciones alcalinas, por lo que la disociación de protones fenólicos dan lugar a un anión fenolato que es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu. Se forma un complejo azul entre el fenolato y el reactivo independientemente de la estructura del compuesto fenólico, como se observa en la Figura 7 (Huang *et al.*, 2005).

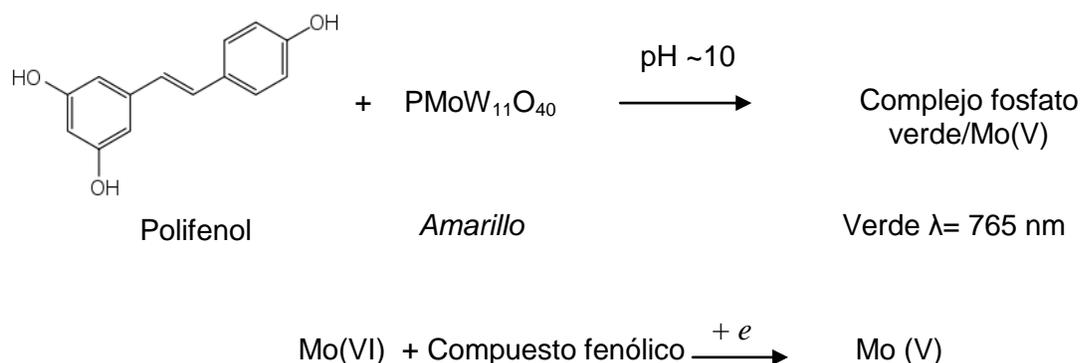


Figura 7. Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin Ciocalteu.

La mezcla de reacción consistió de 500  $\mu\text{L}$  de muestra con 4.5 mL de agua, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu y 500  $\mu\text{L}$  de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se agitaron los tubos y se adicionaron por último 4.3 mL de agua destilada. Se leyó la absorbencia a 765 nm

después de 1 h de reposo en la oscuridad. El contenido total de polifenoles fue calculado en equivalentes de ácido gálico y en equivalentes Trolox (Singleton *et al.*, 1999).

Para determinar el rendimiento de las extracciones, se cuantificaron los polifenoles de cada muestra por el método de Folin-Ciocalteu. Se evaluó la concentración de polifenoles totales en todas las muestras obtenidas por los distintos métodos de extracción.

### 5.7 Cuantificación de flavonoides

Los grupos hidroxilo de las posiciones 3 y 5 en flavonoides, son revelados por desplazamiento batocrómico causado por la reacción con cloruro de aluminio, como en la Figura 8

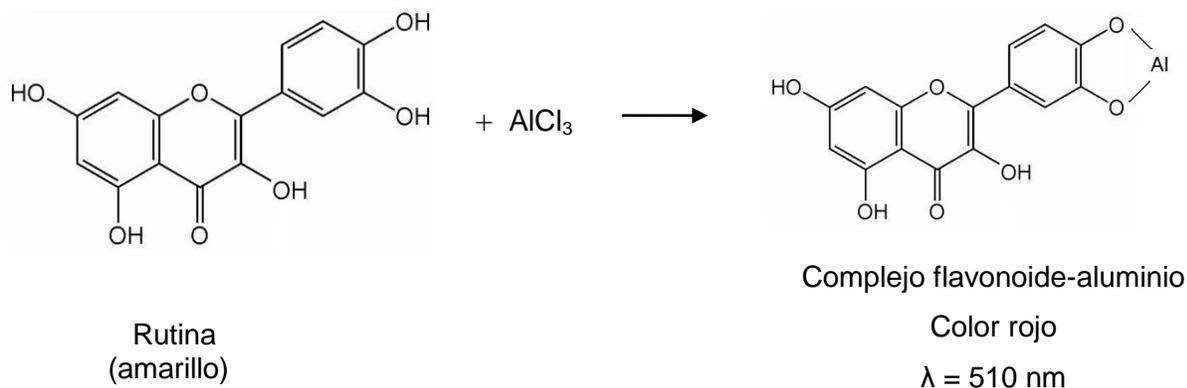


Figura 8. Reacción de flavonoides (rutina) con tricloruro de aluminio (O' Coinceanainn *et al.*, 2003).

Se determinan usando rutina como compuesto de referencia. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto de cada parte de la planta del muérdago, diluido con 1250  $\mu\text{L}$  de agua destilada y mezclada con 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5%. Tras reposar 6 min, se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% dejando reposar 5 min. Después de esto se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M y 425  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La absorbencia fue leída inmediatamente a 510 nm (García-Nava, 2007).

### 5.8 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 a color amarillo. La reacción de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> se observa en la Figura 9. El cambio de coloración de este compuesto se monitorea para determinar la concentración de antioxidantes en la muestra de estudio (Brand-Williams *et al.*, 1995).

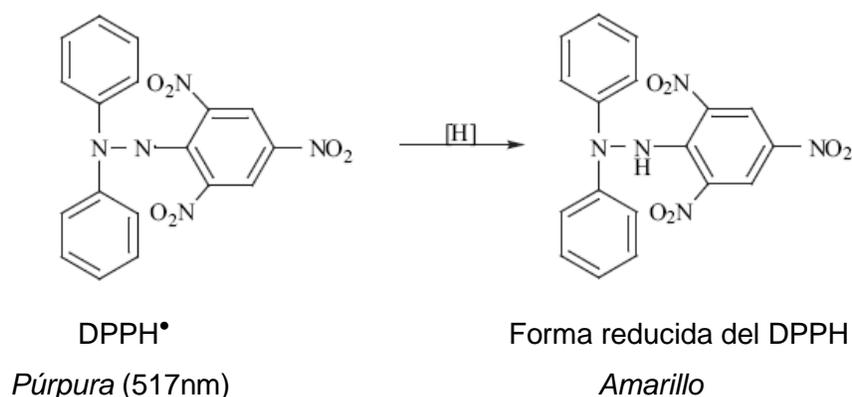


Figura 9. Reacción de reducción del radical DPPH<sup>•</sup>.

En la mezcla de reacción se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH<sup>•</sup> en metanol (0.5 mM) mezclada con la solución muestra (500  $\mu\text{L}$ ) y para completar el volumen de reacción se agregaron 3 mL de metanol. El decremento de absorbencia fue monitoreado a 517 nm después de 45 min de reacción. El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{inhibición} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

$A_{C(0)}$  = Absorbencia del control negativo en el momento de preparación de la solución

$A_{A(t)}$  = Absorbencia de la muestra después de 45 min

Se calculó el valor  $IC_{50}$  que es la concentración de antioxidante necesaria para inhibir 50% de radicales libres (Xie *et al.*, 2008).

### 5.9 Sistema ABTS / lacasa

La característica principal de este método es la utilización del compuesto ABTS para la formación de un radical libre  $ABTS^{\bullet+}$  que actúa como un mediador entre la enzima y el sustrato, facilitando la acción de la enzima. El sistema ABTS/lacasa puede producir el radical  $ABTS^{\bullet+}$  mediante una reacción de transferencia de un electrón en presencia de oxígeno atmosférico. Se monitorea la generación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  a 728 nm (Figura 10) (Soriano *et al.*, 2008).

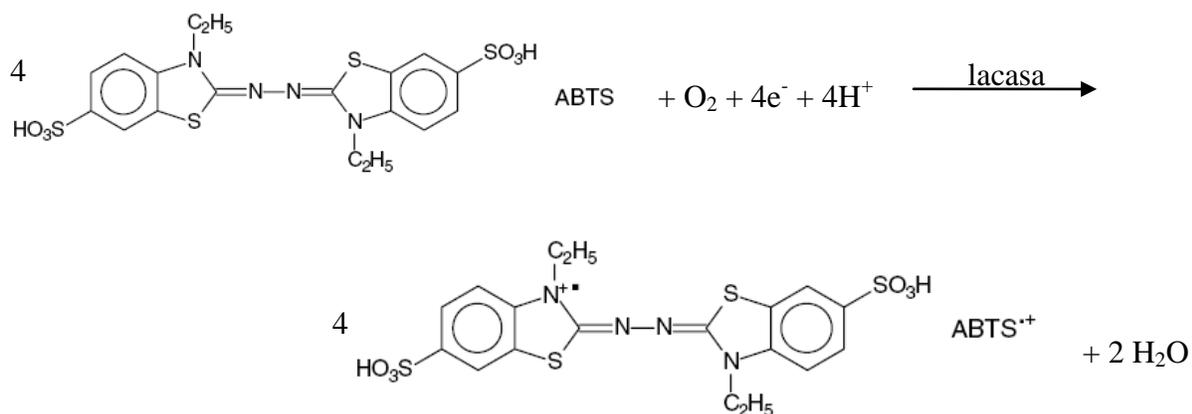
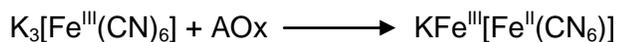


Figura 10. Reacción de formación del radical ABTS por acción de la enzima lacasa.

Se debe preparar una curva estándar con ácido gálico como antioxidante estándar. La mezcla de reacción contiene 100  $\mu\text{L}$  de la enzima, 100  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos, 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 100  $\mu\text{L}$  de la solución de ácido gálico o muestra y 100  $\mu\text{L}$  de ABTS 0.05 mM en amortiguador de acetatos 0.1M a pH 4. Se determina el tiempo lag de inhibición de formación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  siguiendo la reacción en espectrofotómetro a 728 nm.

### 5.10 Poder reductor

El hexacianoferrato de potasio, con  $\text{Fe}^{+3}$  se reduce en presencia de antioxidantes a  $\text{Fe}^{+2}$  formando un complejo  $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN}_6)]$  de color azul que absorbe a una longitud de onda de 700 nm (Figura 11) (Yen y Chen, 1995).



*Hexacianoferrato de potasio*      *Azul de Prusia, 700nm*

Figura 11. Reacción de formación de complejo colorido con hexacianoferrato de potasio para la evaluación del poder reductor.

Se mezcló la muestra con 500  $\mu\text{L}$  de hexacianoferrato de potasio, incubándose a  $50^\circ\text{C}$  durante 20 min. Posteriormente se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 500  $\mu\text{L}$  de cloruro férrico. La absorbencia es medida a 700 nm después de 10 min de reposo (Oyaizu, 1986).

### 5.11 Actividad quelante sobre $\text{Fe}^{2+}$

El  $\text{Fe}^{2+}$  forma un complejo con 3 moléculas de ferrozina de color púrpura que presenta absorbencia máxima a 562 nm. En presencia del antioxidante el  $\text{Fe}^{2+}$  puede quelarse y la intensidad de color púrpura del complejo con ferrozina es menor y es proporcional a la concentración del antioxidante en la muestra de interés (Figura 12) (Xie *et al.*, 2008).

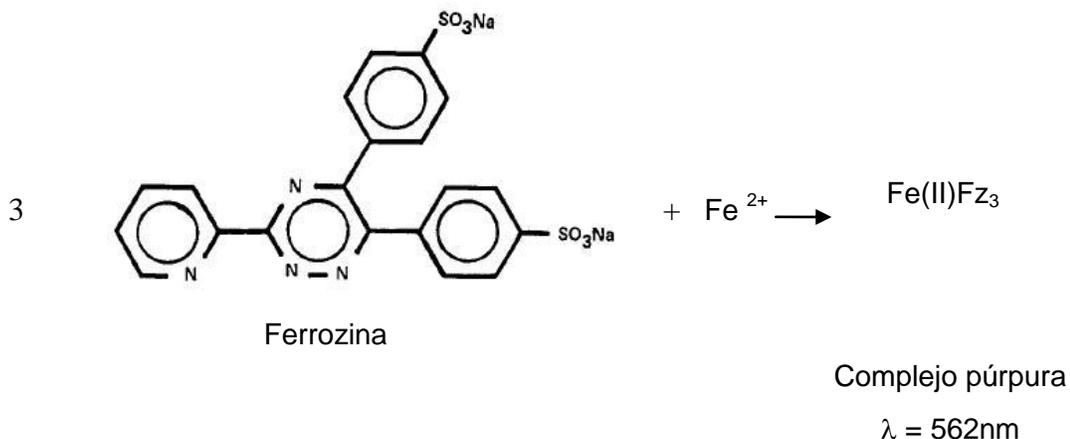


Figura 12. Reacción de quelación de ferrozina para formación de complejo colorido

Se mezcló 1 mL de solución muestra con 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$  y 1.85 mL de agua destilada. Después se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de ferrozina y se leyó la absorbencia a 562 nm después de 10 min de reposo a temperatura ambiente. Como control se usó agua destilada. Para determinar el porcentaje de quelación se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efecto quelante} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

### 5.12 Evaluación de actividad antioxidante *in vivo*

Se evaluó la actividad antioxidante *in vivo* en ratas de la cepa Wistar de 4 meses de edad con un peso entre 300 y 350 g, con lipoperoxidación inducida. La metodología con modificaciones del método propuesto por El-Haffidi y Baños (1997) se muestra en la Figura 13.

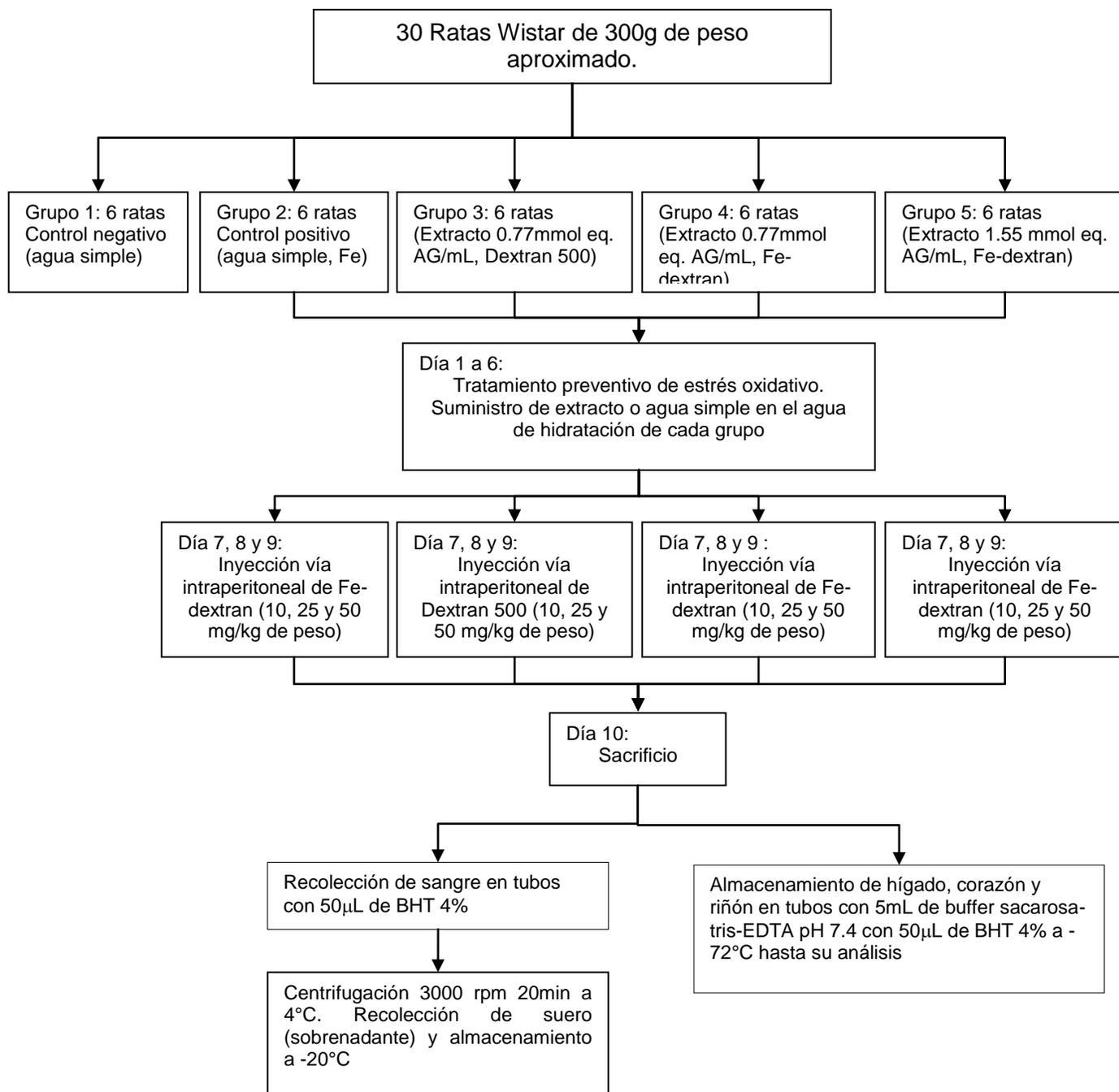


Figura 13. Estrategia experimental para la evaluación de actividad antioxidante *in vivo*.

Se evaluó la concentración de malondialdehído generado como producto de la lipoperoxidación en el suero sanguíneo de las ratas, siguiendo la metodología de la Figura 14 (El Haffidi y Baños, 1997).

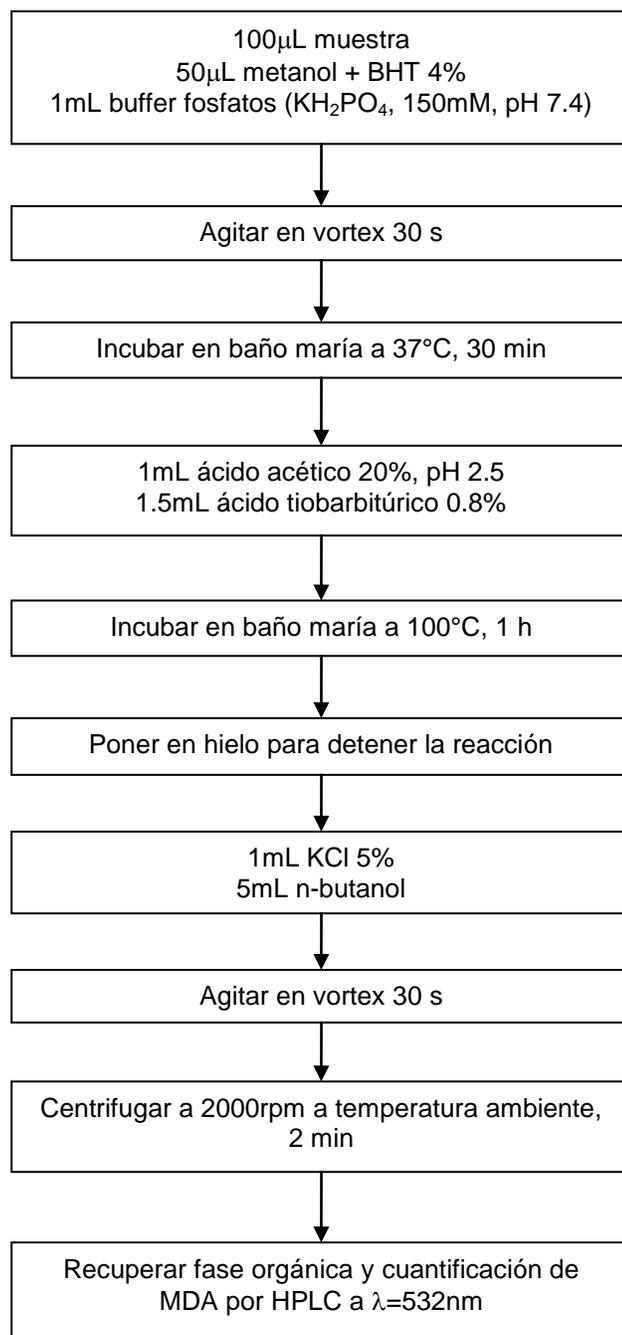


Figura 14. Estrategia experimental para la evaluación de TBARS en suero sanguíneo de ratas Wistar

Para la cuantificación de malondialdehído por HPLC, se usó un equipo Waters 600 con bomba cuaternaria. Para lograr la separación de la muestra, se usó una columna C<sub>18</sub> Resolve 90 de

3.9 x 150 mm Waters y detector de arreglo de diodos a 532 nm para cuantificar el malondialdehído de la muestra inyectada. Los resultados fueron procesados por el software Millennium 32.

Se inyectó un volumen de 5  $\mu$ L de muestra con un una mezcla de buffer de fosfatos 50 mM a pH 6.8 y metanol (70:30) burbujeada con nitrógeno para eliminar aire. Tanto las muestras como la fase móvil, fueron previamente filtradas a través de una membrana millipore de 45  $\mu$ m. La elución fue isocrática a un flujo de 0.8 mL/min y el tiempo de corrida para cada muestra fue de 10 min.

### 5.13 Evaluación de efecto citotóxico

Se evaluó el efecto citotóxico del extracto acuoso de fruto de muérdago en la línea celular ZR-75 de cáncer de mama, siguiendo la metodología de García-Gasca *et al.* (2002).

Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) enriquecido con 10% de suero fetal bovino en cajas de 6 mm (4 mL de medio). La composición del medio de cultivo se muestra en la Tabla 5

Tabla 5. Composición del medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Cloruro de calcio	0.2
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6.4
L-glutamina	0.584
L-isoleucina	0.105
L-lisina	0.146
L-leucina	0.105
D-Glucosa	4.5
Rojo fenol	0.0159

El suero es una mezcla compleja de biomoléculas con promotores de crecimiento. Los componentes principales del suero son glucosa, nitrógeno (urea), proteínas, minerales y hormonas que permiten el crecimiento del tejido celular.

Las placas poseen una matriz de colágena para que las células se adhieran y desarrollen citoesqueleto, indicativo de viabilidad. Las células se mantuvieron en las placas a 36°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> para acidificar el medio (Figura 15), este contiene rojo fenol como indicador de acidez.



Figura 15. Incubadora y cámara con atmósfera de CO<sub>2</sub> para cultivo de células ZR-75

Se mantuvieron los cultivos de células 3 semanas después de descongelarlas, favoreciendo su crecimiento en el medio DMEM y haciendo transferencias una vez por semana.

El medio de cultivo se cambió cada tercer día para retirar toxinas propias de la excreción de las células y reponer los factores de crecimiento contenidos en el suero fetal bovino. Para cambiar el medio de cultivo, se trabajó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical. El medio de succionó con bomba de vacío y se adicionaron 4 mL de medio estéril con 10% de suero fetal bovino.

Al presentarse confluencia, se realizaron transferencias. Para realizar la transferencia, se retiró el medio con bomba de vacío y se adicionaron 2 mL de una solución de tripsina con EDTA y se

dejó reposar en incubadora durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 2 mL de medio estéril y se resuspendió para separar por completo las células adheridas a la colágena. Se tomó el volumen total de la placa para verterlo en un tubo y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min para separar las células.

Una vez separadas, se succionó el medio con bomba de vacío y se resuspendieron las células con medio esteril. Para sembrar, se tomó el volumen correspondiente para cada caja y se vertió en la misma en forma de espiral para abarcar toda la superficie.

Para la evaluación del efecto citotóxico se sembró en placas de 24 pozos con una densidad de 30,000 células por pozo.

La siembra en la placa de 24 pozos se realizó como se muestra en la Figura 16:

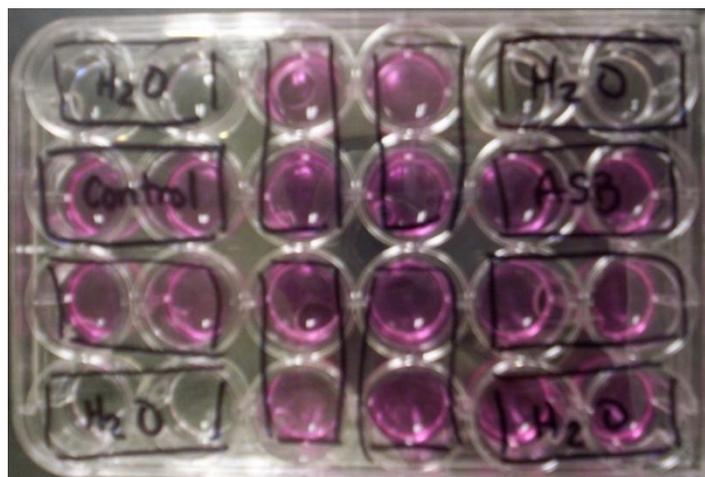


Figura 16. Placa de 24 pozos para evaluación de efecto citotóxico de extracto de muérdago sobre línea celular ZR-75

Después del tercer día se realizó el cambio de condiciones de medio de cultivo, reemplazando el suero fetal bovino por albúmina sérica bovina al 0.5% en el medio DMEM, y con el extracto de muérdago a diferentes concentraciones de polifenoles totales expresadas en equivalentes de ácido gálico. Las concentraciones iniciales de polifenoles totales evaluadas, fueron 10, 1, 0.1 y 0.01 mg eq. AG/mL de medio de cultivo (Figura 17).

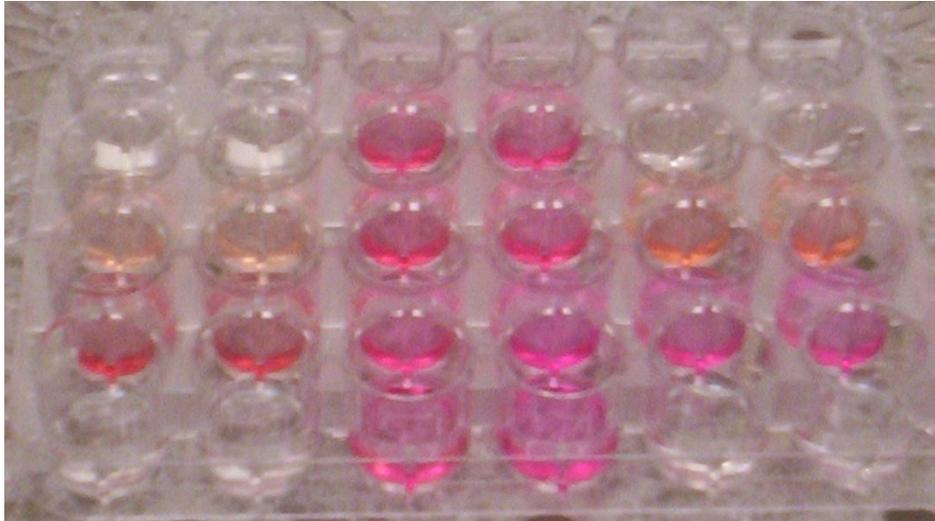


Figura 17. Placa de 24 pozos con diferentes concentraciones de extracto de muérdago para evaluación de efecto citotóxico

Para realizar el cambio de condiciones del medio de cultivo, primeramente se succionó el medio de los pozos con bomba de vacío y se añadieron a los pozos las concentraciones de extracto de muérdago disueltas en el medio de cultivo con BSA.

Se contó el número de células de dos pozos como control inicial del experimento utilizando cámara de Neubauer, contando los ocho campos del hematímetro (Figura 18).

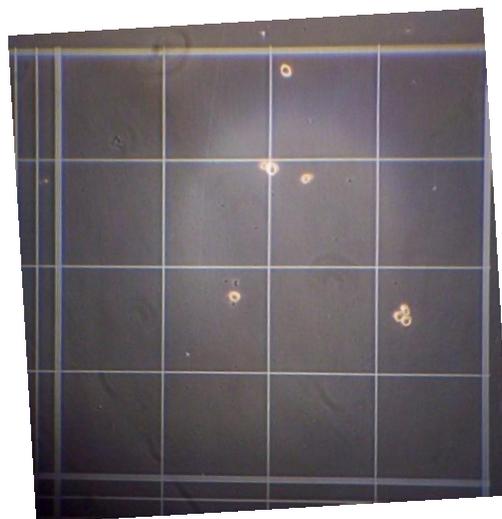


Figura 18. Cámara de Neubauer para conteo de células ZR-75

Después de 24 h de tratamiento con extracto de muérdago, se succionó el medio de cada pozo y se agregó tripsina para separar a las células de la matriz de colágena y se repitieron los pasos para conteo de células al microscopio, realizados para los pozos control.

Para la estimación de células / mL de medio se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de campos contados}} \times 10,000 \times \text{Vol. real de medio en pozo (mL)}$$

$$\% \text{ Sobrevivencia} = \frac{\frac{\text{No. células}}{\text{mL}} \text{ en dilución de extracto}}{\frac{\text{No. células}}{\text{mL}} \text{ en control}} \times 100$$

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis químico proximal

En la Tabla 6 se muestra el análisis químico proximal del muérdago *Cladocolea Ioniceroides*. Los resultados se muestran en cada parte de la planta en estado fresco y en base seca. Estos últimos corresponden a las harinas utilizadas para los análisis. El extracto libre de nitrógeno se determinó por diferencia.

Tabla 6. Análisis químico proximal del muérdago

Componente	Hoja (g/100g)	Hoja (base seca g/100g)	Fruto (g/100g)	Fruto (base seca g/100g)	Tallo (g/100g)	Tallo (base seca g/100g)
Humedad	7.05 ± 0.30	-	9.82 ± 2.23	-	4.37 ± 0.22	-
Cenizas	0.16 ± 0.00	0.17 ± 0.001	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.006	6.30 ± 0.08	6.59 ± 0.08
Proteína cruda	17.73 ± 0.56	19.08 ± 0.59	11.41 ± 0.30	12.65 ± 0.33	13.02 ± 0.29	13.61 ± 0.3
Extracto etéreo	3.92 ± 0.15	4.22 ± 0.16	25.65 ± 1.72	28.44 ± 1.91	3.12 ± 0.79	3.26 ± 0.82
Fibra cruda	5.08 ± 0.37	5.47 ± 0.37	8.46 ± 0.83	9.39 ± 0.92	14.15 ± 0.76	14.80 ± 0.77
Extracto libre de nitrógeno.	66.06	71.07	44.62	49.48	59.04	61.73
Total	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

No se tienen reportes previos del análisis químico proximal del muérdago *Cladocolea Ioniceroides*, por lo que los resultados obtenidos no se pueden comparar con los resultados de otros autores. El contenido de extracto libre de nitrógeno es el más elevado en cualquier parte de la planta analizada. De manera muy importante, resalta el contenido de extracto etéreo en el fruto, ya que el mucílago que segrega es soluble en éter etílico. Este mucílago es el que permite que se adhiera el fruto a la rama del hospedero y comience su desarrollo, pero no se conoce su composición. El contenido de fibra es más elevado en el tallo por la lignina que existe en esta parte de la planta. Todos los componentes se concentran una vez que se elimina el agua y se obtiene la harina que funciona como materia prima para los análisis posteriores.

## 6.2 Determinación de proteína verdadera y perfil electroforético

Con base en el análisis realizado por Tabiasco, *et al.* (2002), se tiene evidencia de que la viscotoxina con actividad biológica, del muérdago *Viscum album*, utilizado por la medicina alternativa en Europa, es de origen peptídico. Las viscotoxinas son un grupo de proteínas pequeñas ricas en cisteína altamente básicas y muy resistentes a agentes desnaturizantes (Tabiasco *et al.*, 2002).

A pesar de que el método de extracción de las viscotoxinas, no es con metanol ni por infusión, sino que su purificación se logra por cromatografía de intercambio iónico, se cuantificó el contenido de nitrógeno total extraído por cada uno de los solventes y por separado en cada parte de la planta, para comprobar si los extractos crudos de muérdago *Cladocolea loniceroides* contienen alguna proteína con actividad biológica.

Se realizó la cuantificación de nitrógeno total y proteína cruda por el método de Kjeldahl, a cada uno de los extractos. Posteriormente, se evaluó la proteína verdadera por el método de Bradford (1976). Los resultados se muestran en la Tabla 7 expresados en gramos por cada 100 g de muestra seca.

Tabla 7. Determinación de proteína cruda y proteína verdadera de cada extracto de muérdago.

Muestra	Proteína cruda (g/100g de muestra)	Extracto	Proteína cruda (g/100g de muestra)	Proteína verdadera (g/100g de muestra)
Hoja	17.73	Acuoso	16.14 ± 0.0	0.96 ± 0.01 <sup>d</sup>
		Metanólico	5.81 ± 0.1	0.28 ± 0.06 <sup>g</sup>
		Saponificación	1.75 ± 0.0	0.052 ± 0.0 <sup>h</sup>
Fruto	11.41	Acuoso	8.57 ± 0.1	2.07 ± 0.03 <sup>b</sup>
		Metanólico	9.97 ± 0.2	2.75 ± 0.08 <sup>a</sup>
		Saponificación	1.75 ± 0.0	0.74 ± 0.03 <sup>e</sup>
Tallo	13.02	Acuoso	6.12 ± 0.1	1.31 ± 0.03 <sup>c</sup>
		Metanólico	4.66 ± 0.1	0.52 ± 0.05 <sup>f</sup>
		Saponificación	2.04 ± 0.06	0

Se puede observar que de acuerdo al análisis bromatológico realizado a cada parte de la planta al inicio de este estudio, la hoja presentó una mayor concentración de proteína cruda con un 17.73% en harina. Para esta muestra, el agua extrae casi la totalidad de la proteína cruda, sin embargo, el contenido de proteína verdadera fue de alrededor del 1% en el extracto.

La concentración de proteína verdadera en cada extracto fue muy baja, evaluada por el método de Bradford. Sin embargo, estas evaluaciones se realizaron en extractos crudos, no purificados, a diferencia del trabajo de Tabiasco *et al.*, (2002), donde la extracción se realizó con una solución de metanol-agua (1:1) y de este extracto se realizó una purificación con ciclohexano, diclorometano y acetato de etilo. Para descartar que los resultados para *Cladocolea loniceroides* fueran falsos positivos, se realizaron electroforesis en geles de SDS PAGE (Figura 19).

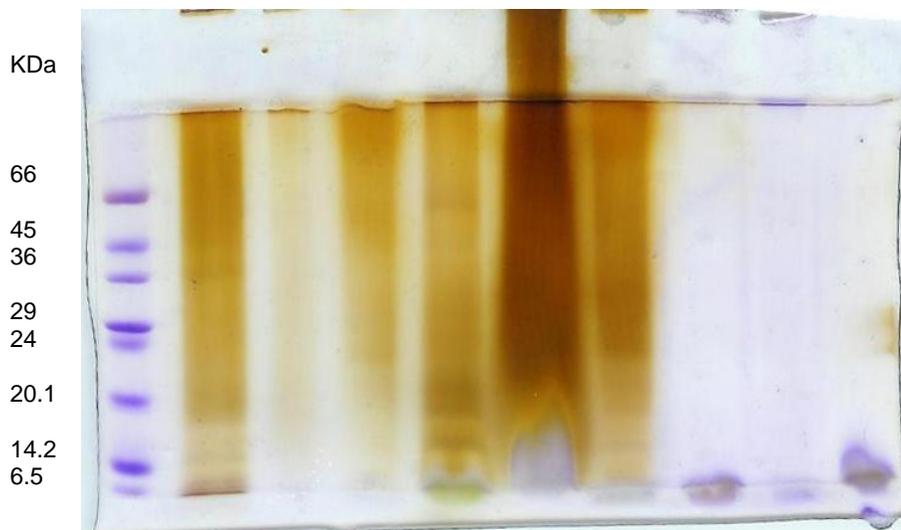


Figura 19. Perfil electroforético SDS-PAGE de los extractos acuoso, metanólico y por saponificación de cada parte del muérdago. (1) marcador, (2) hoja acuoso, (3) fruto acuoso, (4) tallo acuoso, (5) hoja metanólico, (6) fruto metanólico, (7) tallo metanólico, (8) hoja saponificación, (9) fruto saponificación, (10) tallo saponificación.

El muérdago europeo *Viscum album* tiene viscotoxinas de carácter proteico con actividad biológica. Sin embargo, los extractos del fruto de *Cladocolea loniceroides* tienen hasta un 2%

de proteína verdadera, pero en el gel de electroforesis no aparecen las bandas claras, posiblemente por ser un extracto crudo. La tinción convencional con azul de Coomasie no mostró bandas correspondientes a proteínas. Para lograr el perfil electroforético mostrado en la Figura 20, se realizó tinción con plata, ya que es un método más sensible.

Las bandas ligeras que se ven en los carriles 2 y 5 corresponden a extracto acuoso y metanólico de hoja, respectivamente; sin embargo, la concentración no se considera importante, ya que es necesaria una purificación de los extractos para obtener una mayor concentración de proteína y apreciar claramente las bandas de estos carriles.

### 6.3 Cuantificación de polifenoles

La Tabla 8 muestra el rendimiento de polifenoles totales de las diferentes extracciones de harina de hoja de muérdago.

Tabla 8. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de harina de hoja de muérdago.

Disolvente	Tiempo (min)	Polifenoles (mg eq. ác. gálico/g)	Polifenoles (mg eq. Trolox/g)
Agua	30	7.85 ± 0.22 <sup>c</sup>	28.97 ± 0.81
	60	8.56 ± 0.08 <sup>c</sup>	31.60 ± 0.3
Agua a ebullición	5	93.33±0.94 <sup>a</sup>	343.66±3.51
Metanol	30	6.00 ± 0.36 <sup>d</sup>	22.06 ± 1.36
	60	26.33 ± 0.97 <sup>b</sup>	96.71 ± 3.63
Saponificación	30	4.17 ± 0.27 <sup>e</sup>	15.325 ± 1.03
<i>Viscum album</i> *		0.180	-

\* Budzianowski y Budzianowska, 2006.

Para la hoja, la condición de extracción con la que se obtiene el mayor rendimiento de polifenoles, fue con el agua a temperatura de ebullición, por lo que los polifenoles que se encuentran con mayor concentración son hidrosolubles; a pesar de esto, la extracción con agua a temperatura ambiente no fue tan eficiente como la infusión.

La siguiente extracción más eficiente es con metanol manteniendo en agitación durante 2 h.

La saponificación no es un método eficiente para lograr la extracción, por lo tanto el resultado sugiere que no hay polifenoles asociados a la pared celular que hayan quedado libres al romper la misma y además los existentes de forma libre no resistieron el tratamiento térmico alcalino.

Las extracciones que se tomaron para la evaluación de la actividad antioxidante, fueron la infusión, la extracción metanólica de 2 h y la saponificación.

La Tabla 9 muestra las concentraciones de polifenoles extraídas por cada método para el fruto deshidratado.

Tabla 9. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de fruto deshidratado de muérdago.

<b>Disolvente</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Polifenoles (mg eq. ác. gálico/g)</b>	<b>Polifenoles (mg eq. Trolox/g)</b>
Agua	30	7.18 ± 0.24 <sup>d,e</sup>	26.45 ± 0.89
	60	14.38 ± 0.5 <sup>d</sup>	53.00 ± 1.86
Agua a ebullición	5	120.33±4.2 <sup>b</sup>	444.15±15.65
Metanol	30	42.45 ± 0.08 <sup>c</sup>	156.69 ± 0.32
	60	189.50 ± 4.9 <sup>a</sup>	700.10 ± 18.23
Saponificación	30	5.185 ± 0.2 <sup>e</sup>	19.103 ± 0.76

No es posible elaborar harina a partir del fruto, ya que presenta un mucílago que no permite el secado, ni su homogenización y tamizado, por lo que se realizó una pasta en mortero, justo antes de comenzar la extracción.

En el caso del fruto, el mayor rendimiento de polifenoles totales se obtuvo con metanol, después de mantenerlo 2 h en agitación. En esta muestra, la fracción antioxidante extraída es mayormente soluble en metanol.

Como en el caso de la hoja, tampoco la saponificación es un método eficiente de extracción de polifenoles.

La Tabla 10 muestra los rendimientos de polifenoles totales obtenidos en las extracciones de harina de tallo.

Tabla 10. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de harina de tallo de muérdago.

Disolvente	Tiempo (min)	Polifenoles (mg eq. ác. gálico/g)	Polifenoles (mg eq. Trolox/g)
Agua	30	12.07 ± 0.22 <sup>c,d</sup>	22.20 ± 0.4
	60	7.50 ± 0.35 <sup>c,d</sup>	27.67 ± 1.3
Agua a ebullición	5	74.53 ± 0.95 <sup>a</sup>	273.68 ± 35.52
Metanol	30	16.38 ± 0.6 <sup>c</sup>	102.48 ± 5.37
	60	31.42 ± 0.4 <sup>b</sup>	115.63 ± 1.5
Saponificación	30	3.59 ± 0.19 <sup>e</sup>	13.166 ± 0.71

El mayor rendimiento de polifenoles totales extraído en harina de tallo, fue con agua a temperatura de ebullición. El comportamiento fue muy parecido a la extracción de harina de hoja, por lo que la fracción antioxidante extraída es más soluble en agua.

Para cada solvente se tomaron las mejores condiciones de extracción para medir la actividad antioxidante en hoja, fruto y tallo. Para todas las muestras, las mejores condiciones fueron la infusión, la extracción metanólica con agitación durante 2 h y la saponificación a 121°C.

Para hoja y tallo, la mejor condición de extracción de polifenoles totales fue con 0.5 g de muestra seca en 25 mL de agua a temperatura de ebullición durante 5 min, siendo 93.33 ± 0.94 y 120.33 ± 4.2 mg eq. AG/g, respectivamente. Por otro lado, para el fruto la extracción más eficiente se obtuvo con 0.5 g de muestra deshidratada en 20 mL de metanol en agitación durante 2 h, con una media de 189.5 ± 4.9 mg eq. AG/g.

De acuerdo a los resultados reportados por Budzianowski y Budzianowska (2006), el contenido de polifenoles totales en *Viscum album* se encuentra muy por debajo de la concentración que presentaron cualquiera de los extractos de *C. Ioniceroides*. En el estudio no se especifica la parte de la planta que se estudia, por lo que es muy probable que sea de la planta completa.

Se tiene evidencia de la importante actividad biológica de *Viscum album* para diversos padecimientos, como el cáncer, la hipertensión, la epilepsia o como coadyuvante en el tratamiento de SIDA, sin embargo, es bien sabido que estas propiedades están dadas por la presencia de viscotoxinas y lectinas, que no son extraídas por ninguno de los métodos planteados en este estudio.

## 6.4 Cuantificación de flavonoides

Se evaluó la concentración de flavonoides, tomando Rutina (quercetina 3-rutinósido) como compuesto de referencia.

Se realizó la evaluación de flavonoides a todos los extractos (acuoso, metanólico y por saponificación) de harina de hoja, tallo y fruto deshidratado con las mayores concentraciones de polifenoles totales. Los resultados se expresan en miligramos equivalentes de rutina por gramo de muestra, y se detallan en la Tabla 11:

Tabla 11. Contenido de flavonoides en cada extracto.

<b>Muestra</b>	<b>Extracción</b>	<b>Flavonoides (mg eq. rutina/g muestra)</b>
Hoja	Acuosa	$8.26 \pm 0.33^d$
	Metanólica	$3.78 \pm 0.15^e$
	Saponificación	$2.54 \pm 0.2^f$
Fruto	Acuosa	$14.21 \pm 0.37^b$
	Metanólica	$36.45 \pm 0.54^a$
	Saponificación	-
Tallo	Acuosa	$9.19 \pm 0.27^c$
	Metanólica	$3.69 \pm 0.21^e$
	Saponificación	$0.18 \pm 0.07^g$

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto metanólico del fruto contiene una mayor concentración de flavonoides con una media de  $61.53 \pm 0.8$  mg eq. de rutina/g de muestra, seguido del extracto acuoso del fruto con una media de  $22.58 \pm 0.55$  que va de acuerdo al color rojo del fruto en su estado maduro; a pesar de ser los extractos con mayor concentración de flavonoides, son significativamente diferentes, por lo que hay una mayor concentración de flavonoides en solventes orgánicos. Por otro lado, la menor concentración de flavonoides la presentó el extracto por saponificación del tallo con una media de  $1.49 \pm 0.05$  mg eq. de rutina.

No es posible llevar a cabo esta evaluación en el extracto por saponificación del fruto, debido a que hay alguna sustancia extraída por este medio que es insoluble en agua. Al entrar en contacto el extracto con agua, la muestra se enturbia, de tal manera que las lecturas en espectrofotómetro no corresponden al cromóforo formado para la evaluación de flavonoides.

En comparación con los polifenoles totales, la concentración de flavonoides fue muy baja. En la Figura 20 se muestra el gráfico comparativo del contenido de flavonoides respecto al total de polifenoles en los extractos acuoso, metanólico y por saponificación de la hoja de muérdago.

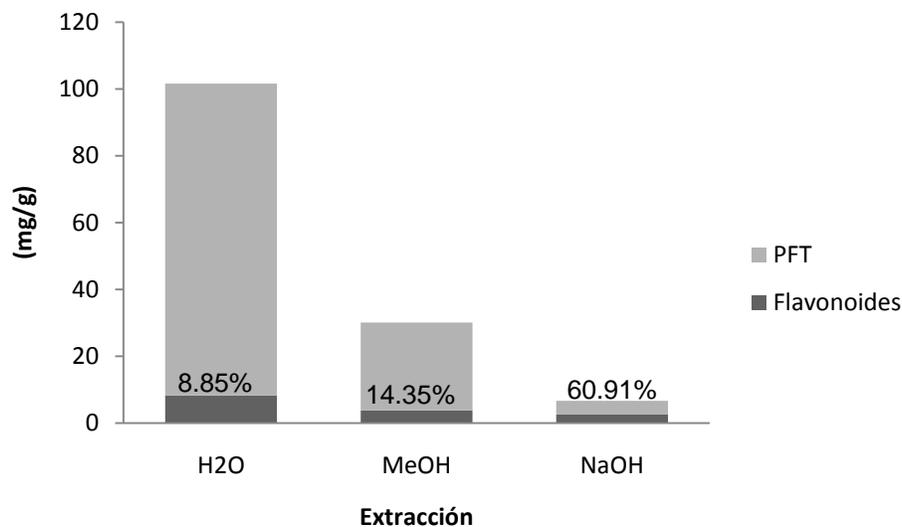


Figura 20. Contenido de flavonoides con respecto al total de polifenoles en harina de hoja de muérdago

La Figura 21 muestra gráficamente la concentración de flavonoides respecto a la concentración de polifenoles totales en los extractos de fruto.

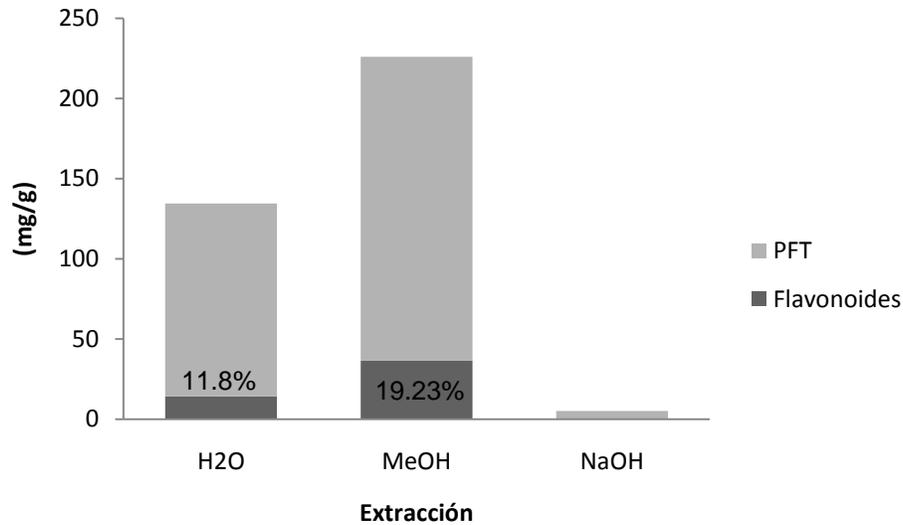


Figura 21. Contenido de flavonoides con respecto al total de polifenoles en fruto deshidratado de muérdago.

La Figura 22 es la gráfica comparativa del contenido de flavonoides respecto a la concentración de polifenoles totales en los extractos de tallo.

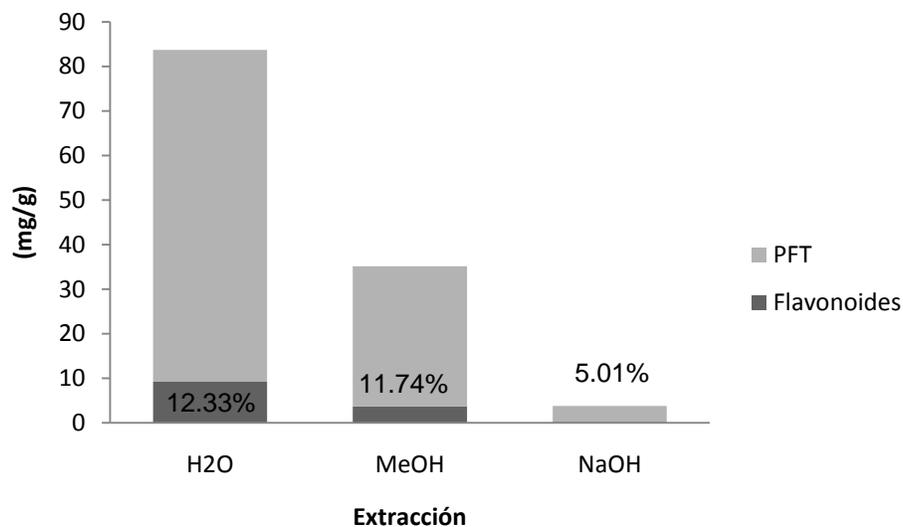


Figura 22. Contenido de flavonoides con respecto al total de polifenoles en harina de tallo de muérdago

La concentración de flavonoides fue muy baja en comparación con la cantidad de polifenoles totales en la muestra, por lo que la composición de polifenoles de la fracción antioxidante debe estar formada por otras familias de compuestos.

Los extractos por saponificación contienen algún compuesto que aún no se ha identificado que no es extraído por los otros métodos. Este compuesto es insoluble en agua, por lo que al entrar en contacto estos extractos con el agua, la muestra se enturbia. Esta turbidez dificulta la cuantificación de flavonoides. En el caso del fruto, este compuesto se encuentra en una mayor concentración por lo que no es posible la cuantificación de flavonoides en este extracto.

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

El porcentaje de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> comparada entre cada extracto, se detalla en la Tabla 12; además se muestran las comparaciones del porcentaje de reducción de DPPH<sup>•</sup> en extractos de *Viscum album* evaluadas por Budzianowski y Budzianowska (2006).

Tabla 12. Porcentajes de inhibición de radical DPPH<sup>•</sup> y equivalentes en Trolox de cada extracto de muérdago.

Muestra	Extracción	% Reducción del radical DPPH <sup>•</sup>	Trolox (mg/g)
Hoja	Metanol	83.47 ± 1.77 <sup>b</sup>	1197.99 ± 27.57
	Saponificación	81.29 ± 0.95 <sup>b,c</sup>	582.04 ± 7.44
	Agua	77.46 ± 0.56 <sup>c,d</sup>	1104.55 ± 8.76
Hoja <i>Viscum album</i> *	Butanol	58.33 ± 0.10	-
Fruto	Metanol	83.74 ± 0.41 <sup>b</sup>	1202.23 ± 6.47
	Saponificación	84.83 ± 0.95 <sup>a,b</sup>	609.6 ± 7.44
	Agua	82.62 ± 0.43 <sup>b,c</sup>	1184.92 ± 6.69
Fruto <i>Viscum album</i> *	Butanol	26.44 ± 0.08	-
Tallo	Metanol	90.27 ± 0.12 <sup>a</sup>	1303.89 ± 2
	Saponificación	72.57 ± 0.5 <sup>d</sup>	514.2 ± 39.39
	Agua	84.88 ± 1.81 <sup>a,b</sup>	1219.98 ± 28.18
Tallo <i>Viscum album</i> *	Butanol	69.75 ± 0.11	-

\*(Budzianowski y Budzianowska 2006)

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 capacidad de reducción del radical DPPH'. Por la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ . Se concluyó que el extracto metanólico y acuoso del tallo y la saponificación del fruto, tienen la mayor capacidad de reducción del radical sin diferencias significativas entre ellas con  $90.27 \pm 0.12$ ,  $84.87 \pm 1.8$  y  $84.83 \pm 0.95\%$ , respectivamente. Estos porcentajes de inhibición corresponden a las concentraciones en equivalentes de Trolox de  $1303.89 \pm 2$  mg eq de Trolox para el extracto metanólico de tallo,  $1219.98 \pm 28.18$  para el extracto acuoso del tallo y de  $609.6 \pm 7.44$  para la saponificación del fruto.

El extracto butanólico estudiado por Budzianowski y Budzianowska (2006) tiene una baja capacidad de reducción de DPPH' en comparación con los extractos de *Cladocolea loniceroides*. El butanol no extrae los mismos componentes que el metanol y el agua, por lo que la fracción disuelta en el mismo no tiene una elevada capacidad de inhibir el radical. Comparando ambas fuentes, *V. album* y *C. loniceroides*, esta última es la que tiene una mejor capacidad de inhibición de radicales por cualquiera de los métodos de extracción propuestos para hoja, tallo y fruto.

La evaluación del valor  $IC_{50}$  para cada muestra, que corresponde a la concentración de extracto en equivalentes de Trolox, a la cual se tiene el 50% de inhibición del radical, se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores  $IC_{50}$  de reducción de radical DPPH' de cada extracto de muérdago.

Muestra	Extracción	$IC_{50}$ (mg eq. Trolox/g)
Hoja	Acuosa	0.124
	Metanólica	2.15
	Saponificación	1.79
Fruto	Acuosa	0.39
	Metanólica	3.04
	Saponificación	1.06
Tallo	Acuosa	0.065
	Metanólica	0.81
	Saponificación	1.55

Las extracciones acuosas para hoja, tallo y fruto, tienen un valor IC<sub>50</sub> menor que el resto de los extractos, por lo que estos extractos reducen el 50% del radical con una menor concentración de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico. Por lo contrario, la saponificación reduce el 50% del radical con una mayor concentración de polifenoles totales. Así, los extractos acuosos presentan un mayor poder antioxidante evaluado bajo estas condiciones.

## 6.6 Sistema ABTS/lacasa

Los resultados obtenidos para cada extracto, se muestran en la Tabla 14:

Tabla 14. Evaluación del sistema ABTS/lacasa y ABTS/DeniLite IIS de los extractos de muérdago.

Muestra	Extracción	Concentración (mg eq. AG/g)	
		DeniLite IIS	<i>Rhus vernicifera</i>
Hoja	Acuoso	17.6 ± 1 <sup>b</sup>	22.64 ± 0 <sup>b</sup>
	Metanólico	3.36 ± 0.22 <sup>d,e</sup>	14.26 ± 0 <sup>c</sup>
	Saponificación	0.18 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.96 ± 0.14 <sup>d</sup>
Fruto	Acuoso	10.6 ± 1 <sup>c</sup>	21.01 ± 2.82 <sup>b</sup>
	Metanólico	2.44 ± 0.19 <sup>d,e</sup>	40.22 ± 3.21 <sup>a</sup>
	Saponificación	---	---
Tallo	Acuoso	39.84 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.01 ± 2.82 <sup>b</sup>
	Metanólico	6.78 ± 0.24 <sup>c,d</sup>	35.65 ± 8.02 <sup>a</sup>
	Saponificación	0.18 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.77 ± 0 <sup>d</sup>

Para la preparación comercial DeniLite IIS, el extracto con mayor concentración de equivalentes de ácido gálico fue la infusión de tallo, con una media de 39.84 ± 0.4 mg eq. ác. gálico / g. Mientras que para la lacasa pura aislada de *Rhus vernicifera*, el extracto con mayor concentración fue el metanólico del fruto con una media de 40.22 mg eq AG / g.

Estos sistemas a pesar de funcionar con lacasas, cada enzima es distinta y en el medio de reacción actúan de manera diferente.

Como en el método de cuantificación de flavonoides, algún componente desconocido extraído durante la saponificación, que es insoluble en agua, no permite la evaluación por este método, ya que en la mezcla de reacción al entrar en contacto la muestra con agua, se enturbia y la lectura en espectrofotómetro es imposible.

Tras la evaluación de la actividad antioxidante por tres métodos distintos de óxido-reducción, se muestra una tabla comparativa de todos los métodos y todos los extractos en la Tabla 15.

Tabla 15. Resumen de la actividad antioxidante evaluada por tres métodos de óxido-reducción de los extractos acuoso, metanólico y por saponificación del muérdago.

Muestra	% inhibición DPPH•	Inhibición eq. Trolox	ABTS/DeniLite (mg eq. ác. gálico/g)	ABTS/lacasa (mg eq. ác. gálico/g)	IC <sub>50</sub> (mg eq. Trolox)
H, H <sub>2</sub> O	77.4 ± 0.5 <sup>c,d</sup>	1104.5 ± 8.7	17.6 ± 1 <sup>b</sup>	22.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.124
F, H <sub>2</sub> O	82.6 ± 0.4 <sup>b,c</sup>	1184.9 ± 6.6	10.6 ± 1 <sup>c</sup>	21.0 ± 2.8 <sup>b</sup>	0.39
T, H <sub>2</sub> O	84.8 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	1220 ± 28.1	39.84 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.0 ± 2.8 <sup>b</sup>	0.81
H, MeOH	83.4 ± 1.7 <sup>b</sup>	1198 ± 27.5	3.36 ± 0.22 <sup>d,e</sup>	14.2 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.15
F, MeOH	83.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	1202.2 ± 6.4	2.44 ± 0.19 <sup>d,e</sup>	40.2 ± 3.2 <sup>a</sup>	3.04
T, MeOH	90.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	1303.8 ± 2	6.78 ± 0.24 <sup>c,d</sup>	35.6 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.065
H, NaOH	81.2 ± 0.9 <sup>b,c</sup>	582.0 ± 7.4	0.18 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>d</sup>	1.79
F, NaOH	84.8 ± 0.9 <sup>a,b</sup>	609.6 ± 7.4	ND	ND	1.06
T, NaOH	72.5 ± 0.5 <sup>d</sup>	514.2 ± 39.3	0.18 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>d</sup>	1.55

En la Tabla 15 se observa que el extracto metanólico y acuoso del tallo tienen la mayor actividad antioxidante; significativamente superior al resto de los extractos ( $p \leq 0.05$ ). Cada extracto tiene diferente actividad y no se comportan igual en cada ensayo, ya que se intenta simular las condiciones de estrés oxidativo que sufre la célula, con mediciones bajo condiciones específicas.

Los métodos de defensa de los antioxidantes, pueden ser por la reducción de radicales libres ya existentes o por el impedimento en la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Estos sistemas evaluados simulaban estas condiciones.

### 6.7 Poder reductor

Para la determinación del poder reductor del ión  $\text{Fe}^{2+}$  se utilizó glutatión reducido como compuesto de referencia, en un rango de concentraciones de 0 a 1 mg/mL en intervalos de 0.2 mg/mL. Se ajustaron estas mismas concentraciones de polifenoles totales en miligramos equivalentes de ácido gálico, para cada muestra y así comparar la reducción del ion  $\text{Fe}^{2+}$ .

Los resultados obtenidos para harina de la hoja, fruto deshidratado y harina del tallo se muestran en las Figura 23, Figura 24 y Figura 25, respectivamente. El poder reductor se determina por el comportamiento ascendente de la gráfica.

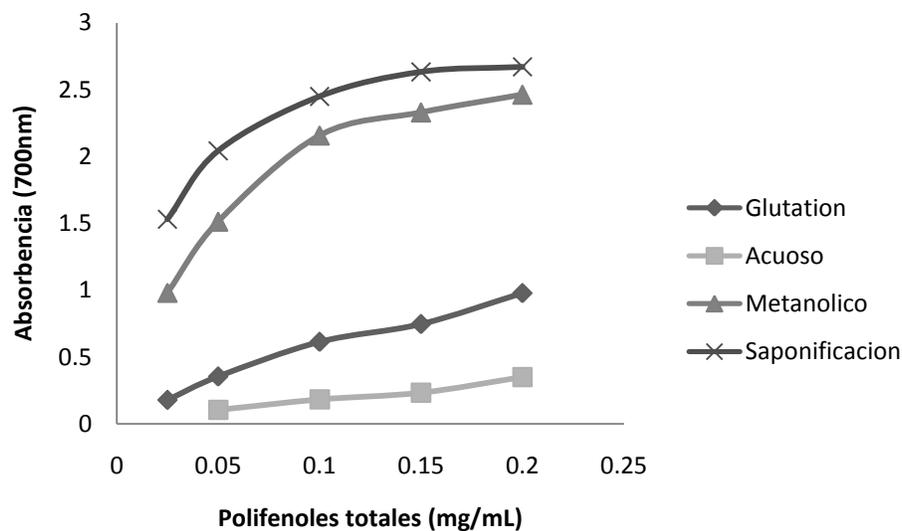


Figura 23. Poder reductor de diferentes extractos de harina de hoja

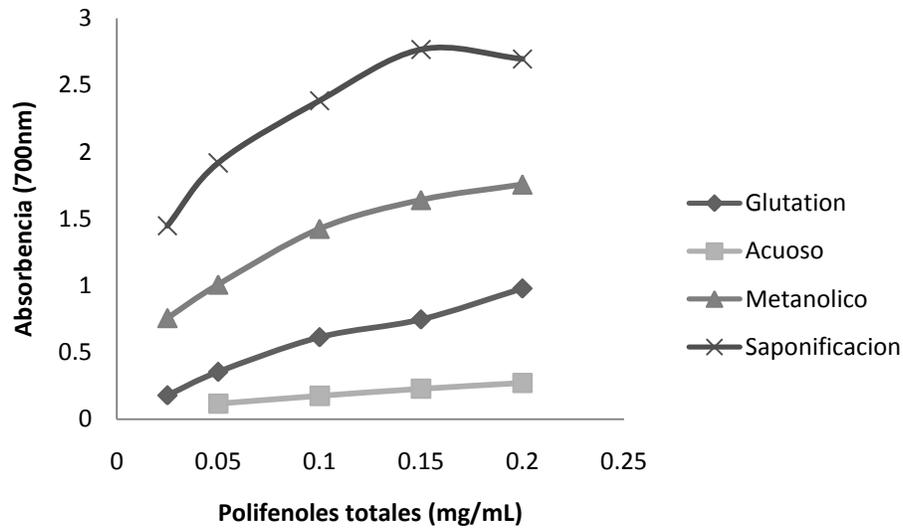


Figura 24. Poder reductor de diferentes extractos de fruto deshidratado.

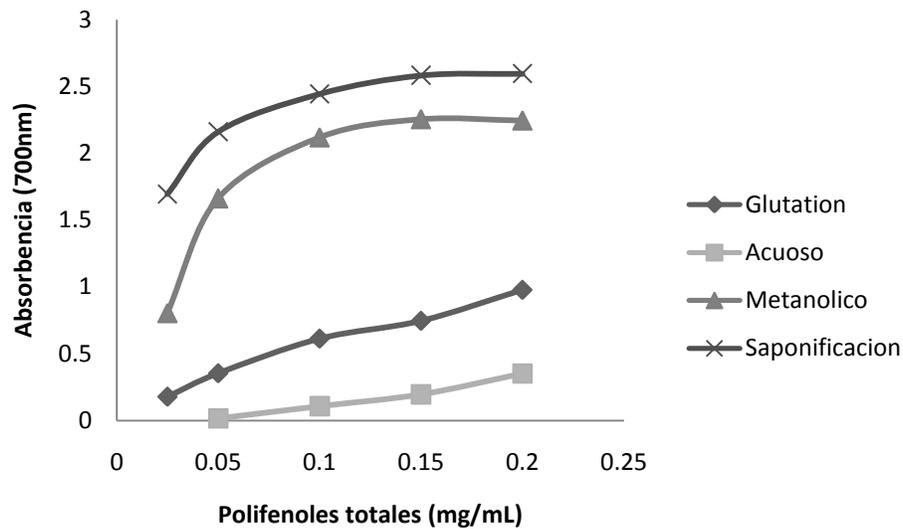


Figura 25. Poder reductor de diferentes extractos de harina de tallo.

Una gráfica ascendente de concentración de polifenoles o glutatión reducido versus absorbancia, refleja una capacidad de reducción del  $\text{Fe}^{2+}$ . Todos los extractos presentaron poder reductor. Los extractos metanólicos y las saponificaciones presentaron un poder reductor

superior al del glutatión reducido utilizado como referencia, mientras que los extractos acuosos no presentaron poder reductor.

El glutatión reducido es un tripéptido con poder antioxidante, cuya reacción de reducción, es:



En donde su poder reductor se debe a la donación de hidrógenos al compuesto oxidante. Por este método se determina cuál es el mecanismo de reducción de radicales, ya sea por transferencia de hidrógenos (poder reductor del glutatión reducido) o por la transferencia de electrones.

Los extractos metanólico y por saponificación de hoja, tallo y fruto presentaron la capacidad de reducción de radicales libres por la transferencia de hidrógenos, determinado por el comportamiento ascendente de la gráfica al aumentar la concentración de polifenoles totales. Por otro lado, los extractos acuosos no presentaron un mecanismo de reducción por transferencia de hidrógenos preferentemente, por lo que estos extractos deben reducir las especies reactivas de oxígeno por el mecanismo de transferencia de electrones.

## 6.8 Actividad quelante contra Fe

La actividad quelante que presentan los extractos, se determina por el comportamiento ascendente de la gráfica del porcentaje de quelación del metal con respecto a la concentración de polifenoles totales. Se tomó como referencia la actividad quelante del EDTA (usado como antioxidante en la industria por su potente actividad de quelación). Las gráficas de los resultados obtenidos para harina de hoja, fruto deshidratado y harina de tallo, se muestran en las Figura 26 Figura 27 y Figura 28, respectivamente.

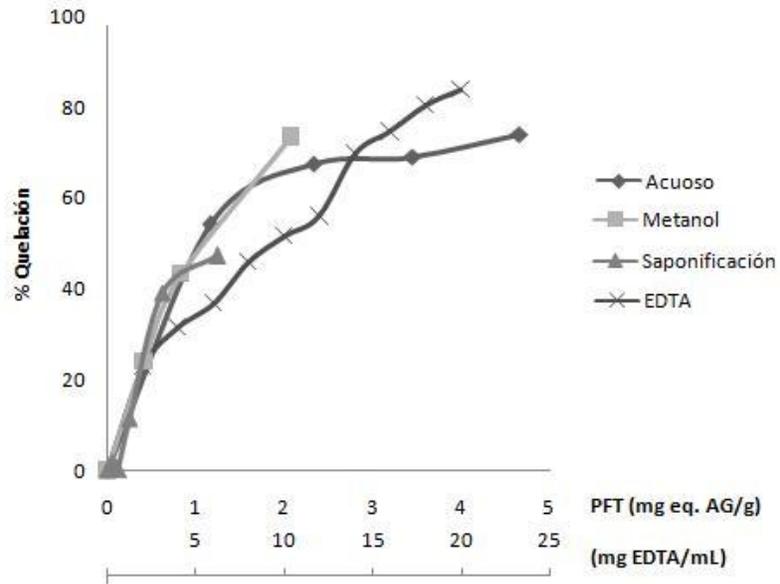


Figura 26. Actividad quelante de cada extracto de harina de hoja de muérdago comparada con EDTA

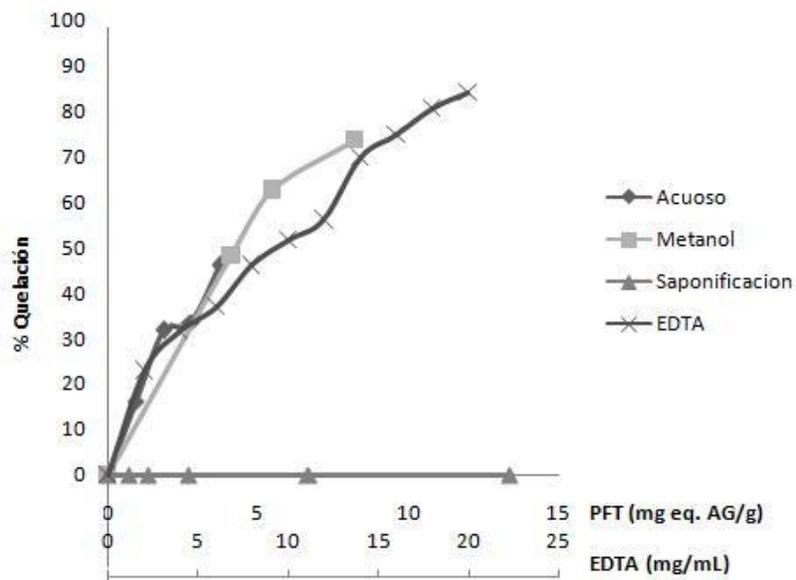


Figura 27. Actividad quelante de cada extracto de fruto deshidratado de muérdago comparada con EDTA

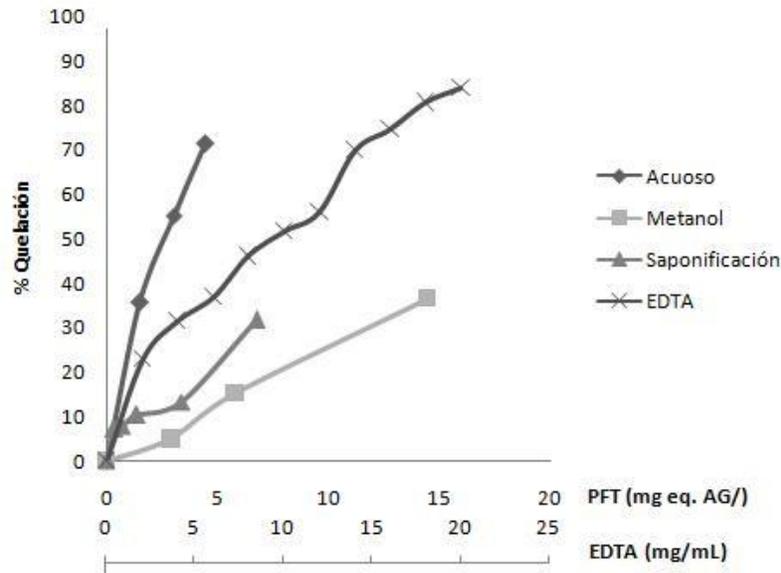


Figura 28. Actividad quelante de cada extracto de harina de tallo de muérdago comparada con EDTA

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. Los extractos de muérdago presentaron capacidad quelante, ya que siguieron una dependencia entre la concentración de polifenoles totales y el porcentaje de quelación, misma tendencia que sigue el EDTA tomado como referencia. Sin embargo, los extractos requieren concentraciones de un orden de magnitud superior al EDTA, para tener el mismo efecto.

En el caso del fruto, la saponificación no tuvo capacidad quelante, posiblemente porque durante este proceso de extracción se destruyen los compuestos que tienen esta capacidad y que están presentes en los otros extractos.

### 8.10 Evaluación de la actividad antioxidante *in vivo*

En este ensayo se comprobó la actividad quelante *in vivo* de los polifenoles del extracto de fruto de muérdago sobre hierro, como antes se probó *in vitro*. Se evaluó el extracto acuoso del

fruto, debido a que el fruto del muérdago *V. album* es el utilizado en la medicina alternativa por su elevada actividad biológica, así como por su elevada concentración de polifenoles totales. En el caso del muérdago europeo, la viscotoxina del fruto es aquella que posee la actividad biológica (Tabiasco *et al.*, 2002).

De los extractos del fruto de *C. Ioniceroides*, el metanólico es el que presentó la mayor concentración de polifenoles totales; sin embargo, la infusión tuvo mayor actividad antioxidante. Además al ser tóxico el metanol, la infusión resulta la mejor extracción para realizar las pruebas biológicas.

Determinar la actividad quelante en sistemas vivos es importante debido a que se evita o retarda la lipoperoxidación de las membranas celulares. Las concentraciones de polifenoles totales suministradas como tratamiento preventivo se eligieron de acuerdo a la concentración de hierro que se inyectó a cada animal por kilogramo de peso, de esta manera se suministraron los mismos moles de hierro que de polifenoles totales, mientras que en el último grupo, se trató a los animales con el doble de polifenoles que de hierro que recibieron en la inyección.

Se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) en el suero sanguíneo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El tiempo de retención del MDA bajo las condiciones del equipo mencionadas en la metodología, es de 2.2 min.

La concentración de MDA en cada muestra, se detalla en la gráfica de la Figura 29.

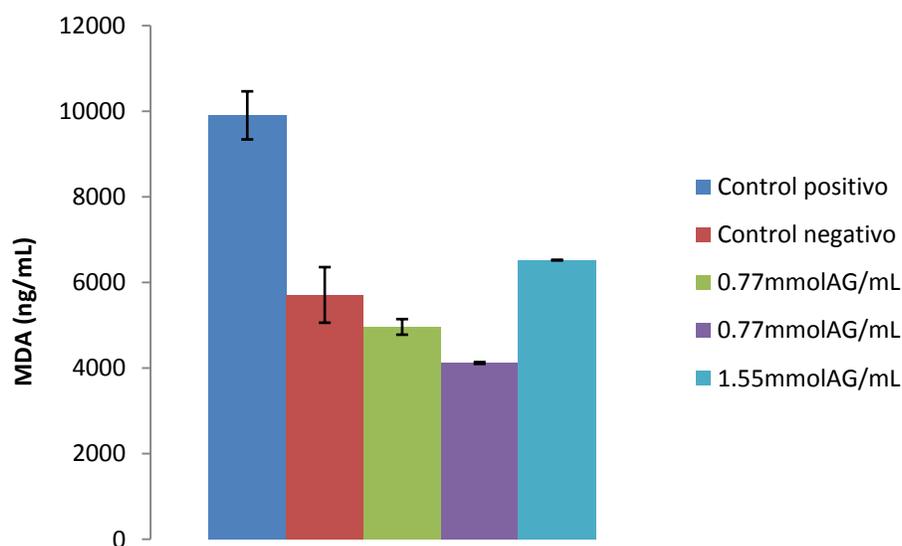


Figura 29. Concentración de malondialdehído (MDA) en grupos de ratas con lipoperoxidación inducida.

De acuerdo al análisis de varianza y a la comparación múltiple de medias, con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ , no hay diferencias significativas entre el control negativo y los grupos que recibieron el tratamiento preventivo con extracto de fruto de muérdago con lipoperoxidación inducida.

El control positivo, es decir, el grupo que no recibió tratamiento preventivo con extracto de muérdago y que le fue inducida la lipoperoxidación, presentó una mayor concentración de malondialdehído, indicativo de mayor oxidación comparada con los demás grupos.

La infusión de fruto de muérdago presentó efecto quelante tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que los polifenoles de este extracto son capaces de atrapar al hierro que inicia la reacción de lipoperoxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares. Si este extracto es administrado vía oral en ratas, es capaz de proteger al sistema de la lipoperoxidación provocada por estrés oxidativo.

## 6.9 Evaluación del efecto citotóxico

Se evaluó el efecto citotóxico del extracto acuoso del fruto de muérdago, sobre la línea celular ZR-75 de cáncer de mama ductal humano.

Se evaluaron varias concentraciones de polifenoles totales de la infusión en equivalentes de ácido gálico, obteniéndose una curva dosis-respuesta que se muestra en la Figura 30.

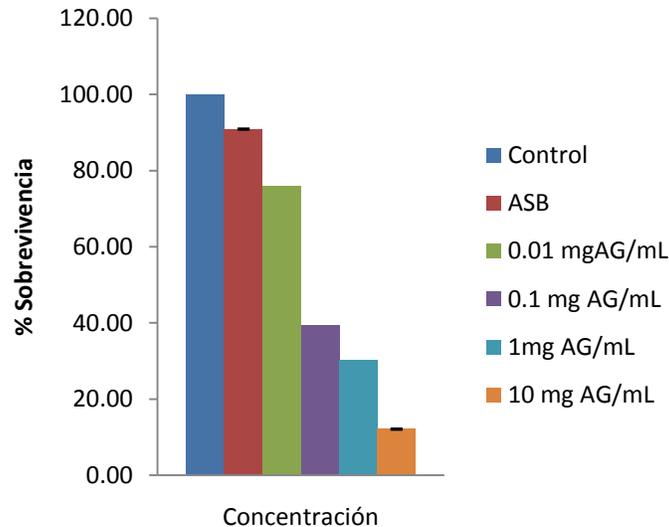


Figura 30. Sobrevivencia de células ZR-75 bajo tratamiento con extracto de fruto de muérdago

En donde se aprecia que las concentraciones de extracto utilizadas tienen un efecto letal sobre el cultivo tratado.

Para determinar exactamente la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), que es la concentración de extracto en equivalentes de ácido gálico, necesaria para tener el 50% de sobrevivencia celular, deben realizarse más experimentos, para obtener resultados concluyentes. Debido a que se realizó un estudio preliminar, se concluye parcialmente que la concentración letal media se encuentra entre 0.01 y 0.1 mg eq. AG/mL de medio de cultivo.

A pesar de que el extracto acuoso del fruto de *C. Ioniceroides* no contiene proteína como la especie *V. album*, utilizado por la medicina alternativa por su actividad biológica, *C. Ioniceroides* sí presenta protección contra la lipoperoxidación en sistemas vivos y además efecto citotóxico sobre la línea celular ZR-75 de cáncer de mama ductal humano.

Para *V. album*, diversos autores han realizado estudios sobre citotoxicidad en varias líneas celulares de melanoma (Thies *et al.*, 2005; Tabiasco *et al.*, 2002; Pryme, 2009). Sin embargo, en estos estudios se evaluó la actividad de las viscotoxinas o de las lectinas del muérdago, a diferencia de los extractos de fracción antioxidante evaluadas en este trabajo.

De acuerdo a la cuantificación de proteína verdadera y a la electroforesis realizada, los extractos de hoja, fruto y tallo de *C. Ioniceroides* no mostraron proteína perteneciente a



viscotoxinas o lectinas, por lo que la actividad biológica de los extractos se debe a la presencia de compuestos polifenólicos antioxidantes con capacidad de reducir a los radicales libres por el mecanismo de transferencia de hidrógenos y con capacidad de quelar  $Fe^{2+}$ .

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 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.

No existe información acerca de la composición, de la actividad antioxidante ni de la actividad biológica de *Cladocolea loniceroides*, por lo tanto el estudio de esta especie de muérdago es sumamente importante. Además se contribuye al conocimiento científico de una especie endémica de México, que necesariamente debe ser estudiada por instituciones nacionales.

## 7. CONCLUSIONES

El muérdago que infesta a la zona chinampera de Xochimilco se identificó como *Cladocolea loniceroides*, una especie endémica de la región, considerada inútil hasta antes de esta investigación. Sin embargo, las pruebas realizadas a las hojas, tallos y frutos demostraron que contienen polifenoles de diversa naturaleza química, lo cual le confiere una gran actividad antioxidante. Pruebas *in vivo*, utilizando ratas como modelo experimental, mostraron que la actividad antioxidante inhibe la lipoperoxidación. Por otro lado, un extracto acuoso del fruto fue capaz de inhibir el desarrollo de un cultivo de células de cáncer de mama; lo cual indicaría que éste podría utilizarse para la obtención de un extracto estandarizado que contribuya a la prevención y tratamiento de dicho cáncer.

Dicha conclusión se sustenta en los siguientes hallazgos:

- El muérdago de la zona chinampera de Xochimilco se identificó como *Cladocolea loniceroides*. Esta especie fue la única que se encontró en la zona y fecha de estudio.
- Comparativamente, el tallo contiene el mayor contenido de fibra cruda ( $14.80 \pm 0.77$  %) de la planta; la hoja el mayor contenido de proteína cruda y contenido de carbohidratos ( $19.08 \pm 0.59$  % y  $71.07$  %) y el fruto el mayor contenido de extracto etéreo ( $28.4 \pm 1.90$  %).
- El fruto exuda una sustancia viscosa que es soluble en éter etílico, lo que eleva la concentración del extracto etéreo del análisis químico proximal.
- La mayor concentración de polifenoles extraídos de hoja y tallo se obtuvo agregando 25 mL de agua a 500 mg de harina durante 5 min en ebullición. En el caso del fruto se utilizaron 20 mL de metanol por cada 500 mg de la harina agitando la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente.
- La extracción de polifenoles por el método de saponificación en la que se utilizó NaOH 4 M a T ambiente durante 18 y 36 h fue nula. Mientras que cuando se utilizó NaOH 4 M a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 min se obtuvo alrededor del 50% del contenido de polifenoles en comparación a los que se extrajeron con metanol.
- Comparativamente el contenido de polifenoles totales expresado como mg eq. AG de las diferentes secciones de la planta resultó: fruto>hoja>tallo, es decir,  $189.5 \pm 4.9$ ;  $93.33 \pm 0.94$  y  $74.53 \pm 0.95$ , respectivamente.



- En la extracción metanólica del fruto se observó la mayor concentración de flavonoides ( $36.45 \pm 0.54$  mg eq. de rutina/ g). Sin embargo, cuando el extracto se obtiene por saponificación es difícil evaluar la presencia de flavonoides por la presencia de una sustancia desconocida e insoluble en agua que impide la reacción, debido a que la muestra se enturbia al entrar en contacto con la solución acuosa del reactivo utilizado.
- El extracto metanólico del tallo presentó la mayor capacidad de reducción del radical DPPH•, expresada como % Inhibición =  $90.27 \pm 0.127$ , equivalente a  $977.92 \pm 1.5$  mg eq. de Trolox/g.
- El extracto acuoso del tallo presentó el menor IC<sub>50</sub> (0.065 mg eq. Trolox/g), lo que indica que una concentración pequeña de extracto es capaz de reducir al radical DPPH•.
- La capacidad reductora del extracto acuoso del tallo en el sistema ABTS/lacasa (Deni Lite IIS) fue de  $39.84 \pm 0.4$  mg eq. AG/g. Mientras que cuando se utilizó lacasa de *Rhus vernicifera* fue en el extracto metanólico y no acuoso del fruto ( $40.22 \pm 3.21$  mg eq. AG/g) en donde se obtuvo la mayor actividad antioxidante.
- En el extracto obtenido después de la saponificación del fruto también hubo la presencia de una sustancia desconocida insoluble en agua que impidió la evaluación de la actividad antioxidante cuando se aplica el sistema ABTS/lacasa.
- Todos los extractos sin excepción presentaron poder reductor cuando se les comparó en un sistema de óxido-reducción en el que se tomó como referencia al glutatión reducido (GSH). En particular los extractos metanólicos y por saponificación presentaron un poder reductor superior al del GSH en el mismo sistema; mientras que los extractos acuosos comparativamente tuvieron un menor poder reductor que el GSH.
- Todos los extractos sin excepción presentaron actividad quelante ante el Fe<sup>2+</sup> en un sistema *in vitro*, excepto el extracto obtenido por saponificación del fruto, en donde fue nula esta actividad. De la misma manera el extracto acuoso del fruto de muérdago ensayado en ratas con lipoperoxidación inducida con Fe<sup>2+</sup> inhibió el deterioro de los lípidos, ya que no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de malondialdehído (4.11-5.70 µg/mL) entre las ratas de prueba y el grupo control debido a la capacidad que tienen los polifenoles de quelar metales.
- En todos los extractos de muérdago se cuantificó nitrógeno total por el método de Kjeldahl y proteína verdadera por el método del colorante ligado a proteína. Sin embargo cuando los extractos se analizaron por electroforesis ni con la tinción de plata se pudo observar la presencia de bandas de proteína. Lo cual hace pensar que los



compuestos oxidantes de los extractos son polifenoles algunos de ellos nitrogenados y/o compuestos no polifenólicos nitrogenados.

- El contenido de polifenoles del fruto de *Cladocolea loniceroides* observado fue 8 veces mayor que el reportado para *Viscum album* y al aplicarse a la línea celular ZR-75 de cáncer de mama ductal se observó que tiene un efecto citotóxico con una  $CL_{50}$  entre 0.01 y 0.1 mg eq. AG/mL de medio de cultivo.



## 8. RECOMENDACIONES

Para un mejor conocimiento de la fracción antioxidante extraída de hoja, fruto y tallo de muérdago *Cladocolea loniceroides*, se sugieren los siguientes estudios:

- Caracterizar parcialmente el perfil de polifenoles de cada extracto obtenido.
- Continuar con la evaluación del efecto citotóxico de los extractos para determinar la concentración letal media, así como el mecanismo de muerte celular.
- Evaluar el efecto citotóxico en varias líneas celulares de cáncer humano.
- Aislar las viscotoxinas y lectinas en *Cladocolea loniceroides* y evaluar su actividad biológica.

---

**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.

Akinmoladun, A. C., Ibukun, E. O. & Farombi, E. O. (2007). Chemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia boonei*. *African Journal of Biotechnology*. **6**: 1197-1201.

Alvarado-Rosales, D. & 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.

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis. 17<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

Asensio, V., Kille, P., Morgan, A.J., Soto, M., Marigomez, I. (2007). Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *European Journal of Soil Biology*. **43**: 233-238.

Becker, E. M., Nissen, L. R. & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *European food research and technology*. **219**: 561-571.

Beckman, K. & Ames, B. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*. **78**: 547-581.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248.

Brand-Williams, W., Cuvelier, E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*. **28**: 25-30.

- Budzianowski, J. & Budzianowska, A. (2006). Chromatographic and spectrophotometric analyses of the DPPH• free radical scavenging activity of the fractioned extracts from *Lamium album* L., *Lamium, purpureum* L. and *Viscum album* L. *Herba polonica*. **52**: 51-57.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Sinwell, V., Ralph, J. & Steinhart, H. (2002). Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. *European Food Research Technology*. **214**: 482-488.
- Calderón, G. (1979). Loranthaceae. En: *Flora fanerogámica del valle de México, vol. 1*. Ed. CECSA. México: 119-124.
- Chen, I., Chang, H., Yang, H. & Chen, G. L. (2004). Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in microplates. *Journal of Food and Drug Analysis*. **12**: 29-33.
- Cid Villamil, R. M., Ponce S. & M. E. Engleman (2005). Germination of *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae). *XVII International Botanical Congress*. Viena, Austria. 17 al 23 de Julio.
- Decker, E. A. & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **38**: 674-677.
- De la Paz Pérez, C. & Ceja, J. R. (2005). Branches anatomy of *Fraxinus uhdei* (Wenzing) Lingelsheim and *Prunus pérsica* Batsch. Infected by *Cladocolea spp.* (Mistletoe). *XVII International Botanical Congress*. Viena, Austria. 17 al 23 de Julio.
- De la Paz Pérez, C., Cera, J. & Vela, G. (2006). Árboles y muérdagos: una relación que mata. *Contactos*. **59**: 28-34.
- El-Hafidi, M., Baños, G. (1997). *In vivo* plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension*. **30**: 624-628.
- Freshney, I. (1992). Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. En: *Animal cell culture. A practical approach*. 2nd edition. The Practical Approach Series. USA. 15-44.

García Gasca, T., Salazar-Olivo, L.A., Mendiola-Olaya, E. & Blanco-Labra, A. (2002). The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on *in vitro* cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in Vitro*. **16**: 229-233.

García Nava, M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro. 2007. [http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava)

Geils, B.W. & Vázquez, I. (2002). *Loranthaceae* and *Viscaceae* in North America. En: *Mistletoes of North American Conifers*. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, U. S. Department of Agriculture, USA. 1-8.

Gobierno del Distrito Federal. Delegación Xochimilco, <http://www.xochimilco.df.gob.mx/delegacion/index.html> (09-02-2009).

Gutteridge, J. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. **41**: 1819-1828.

Huang, D., Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1841-1856.

Kamal-Eldin, A. & Pokorný, J. (2005). Ultraviolet-Visible spectrophotometry in the analysis of lipid oxidation. En: *Analysis of Lipid Oxidation*. AOCS Press. USA. 17-39.

Khwaja, T.A. (1996). Pharmaceutical preparations derived from European mistletoe. U.S. Patent 5,547,674.

Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología alimentaria*. **25**: 726-732.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.

López de Buen, L. (2005). Propuesta de manejo integral y aprovechamiento del muérdago *Psittacanthus schiedeanus*, para la conservación de las aves silvestres. *1er. Congreso*

*internacional de casos exitosos de desarrollo sostenible del trópico*. Boca del Río, Veracruz. México, 2 al 4 de mayo, 1-10.

Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D. & Uhlenbruck, G. (1979). The lectin from *Viscum album* L.- Isolation, characterization, properties and structure. *International Journal of Biochemistry*. **11**: 429-435.

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R, & van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. **85**: 231-237.

Morales, J., Fernández, A., Bautista, M., Vargas, N. & Madrigal, E. (2009). Epidemiología de las enfermedades crónico degenerativas. En: *Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas*. Edit. Ciencia al Día. México. 269-310.

Ndhala, A., Anthonissen, R., Stafford, G., Finnie, J., Verschaeve, L and Van Staden, J. (2010). *In vitro* cytotoxic and mutagenic evaluation of thirteen commercial herbal mixtures sold in KwaZulu-Natal, South Africa. *South African Journal of Botany*. **76**: 132-138.

O' Coinceanainn, M., Astill, C. & Baderschneider, B. (2003). Coordination of aluminum with purpurogallin and theaflavin digallate. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **96**: 463-468.

Önay-Uçar, E., Karagöz, A. & Arda, N. (2006). Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*. **77**: 556-560.

Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. **35**: 771-775.

Pryme, I. (2009). Orally indigestible preparation of mistletoe lectins and method. U.S. Patent 7,550,159.

Quezada, J. & Santa Cruz, M. (2001). Evaluación de la respuesta de la Begonia Rex a la variación de medios y reguladores de crecimiento en técnicas de cultivo de hojas *in vitro*. *BIOFARBO*. **9**: 79-84.

- Repetto, G., Del Peso, A. & Zurita, J. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*. **3**: 1125-1131.
- Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **20**: 933-956.
- Roberfroid, M. & Buc, P. (1995). Biologically Relevant Radicals. En: *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*. Dekker, Edit. M. Marcel Dekker, Inc, USA. 59-74.
- Roginsky, V. & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. **92**: 235-254.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. **299**: 152-178.
- Soriano-Santos, J., Ugalde-Benítez, V. & Guerrero-Legarreta, I. (2008). A new enzymatic method to assess the total antioxidant activity in foods by using laccase: a polyphenoloxidase. *3<sup>rd</sup>. international congress food science and food biotechnology in developing countries*. Querétaro, Querétaro. México, 14 al 17 de octubre.
- Tabiasco, J., Pont, F., Fournié, J. & Vercellone, A. (2002). Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. **269**: 2591-2600.
- Thies, A., Niger, D., Pfüller, U., Moll, I. & Schumacher, U. (2005). Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology*. **207**: 105-116.
- Urech, K., Jäggy, C. & Schaller, G. (2007). Viscotoxin and mistletoe lectin contents in *Viscum album* L. – Pharmaceutical implications. *Phytomedicine*. **14**: 16.
- Wolfe, K. & Hai, R. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **30**, A-L.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X. & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*. **111**: 370-376.



Yen, G. C. & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**: 27-32.

## APÉNDICES

## Apéndice A

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

En la tabla A se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de polifenoles totales en los extractos de muérdago. Así mismo, en la gráfica, se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) versus absorbencia a 725nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

Tabla A1. Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales.

Acido gálico [mg/L]	Absorbencia (725nm)
25	0.107 ± 0.0015
50	0.219 ± 0.0055
100	0.441 ± 0.0072
150	0.677 ± 0.0025
200	0.898 ± 0.0098

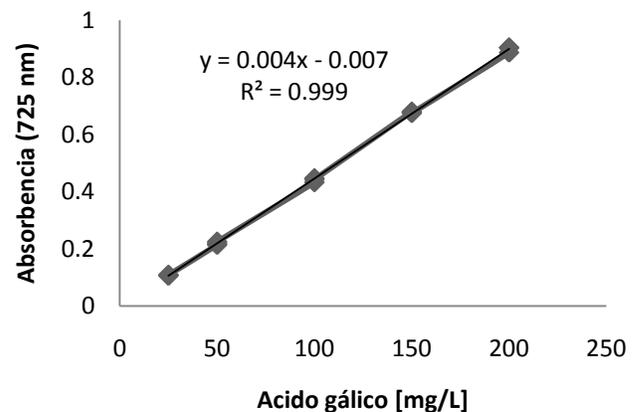


Figura A1. Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

## Apéndice B

Curva estándar en equivalentes de Trolox para la cuantificación de polifenoles totales.

En la tabla A3 se muestran las concentraciones de Trolox utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de polifenoles totales en los extractos de muérdago. En la gráfica, se muestra la curva de Trolox (mg/L) versus absorbencia a 725nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de polifenoles en equivalentes de Trolox.

Tabla A2. Curva estándar de Trolox para cuantificación de polifenoles totales.

Trolox [mg/L]	Absorbencia (725 nm)
125.15	0.156 ± 0.002
250.3	0.281 ± 0.013
500.6	0.508 ± 0.004
625.75	0.660 ± 0.008
750.9	0.792 ± 0.002
876.05	0.986 ± 0.037

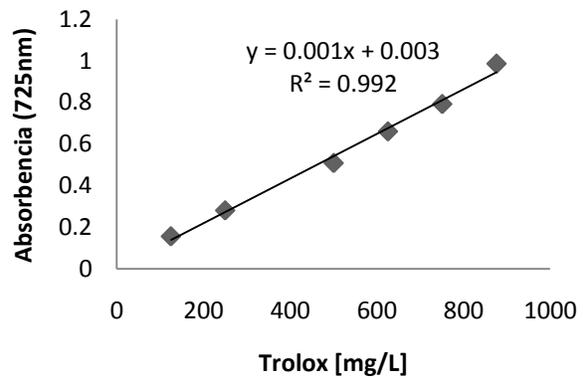


Figura A2. Curva estándar de Trolox para la cuantificación de polifenoles totales.

## Apéndice C

### Curva estándar de rutina para la evaluación de flavonoides.

La curva estándar se muestra en la tabla A3 y la gráfica y ecuación de la recta obtenida, en la figura A3.

Tabla A3 Curva estándar de rutina para cuantificación de flavonoides

Concentración [mg/mL]	Absorbencia (510nm)
0	0
0.1	0.202
0.2	0.351
0.3	0.521
0.4	0.622
0.5	0.754

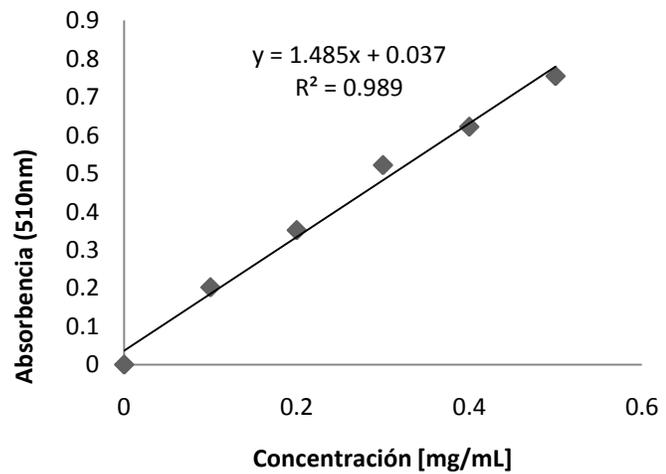


Figura A3 Curva estándar de rutina para la evaluación de flavonoides

## Apéndice D

### Curva estándar en equivalentes de Trolox para la evaluación de la inhibición del radical DPPH•

Se realizó una curva estándar de porcentaje de inhibición del radical con Trolox para determinar la reducción del DPPH• en sus equivalentes. La tabla A4 muestra las concentraciones de Trolox utilizadas versus porcentaje de inhibición del radical en la elaboración de la curva estándar. En la figura A4 se ve gráficamente el comportamiento de la curva y la ecuación de la recta.

Tabla A4. Curva estándar de Trolox para evaluación de equivalentes de reducción de DPPH•

Trolox ( $\mu\text{M}$ )	% Inhibición
20	16.85 $\pm$ 1.3
40	32.87 $\pm$ 0.95
60	46.45 $\pm$ 0.22
80	61.09 $\pm$ 0.45
100	70.32 $\pm$ 0.57
120	81.54 $\pm$ 0.69

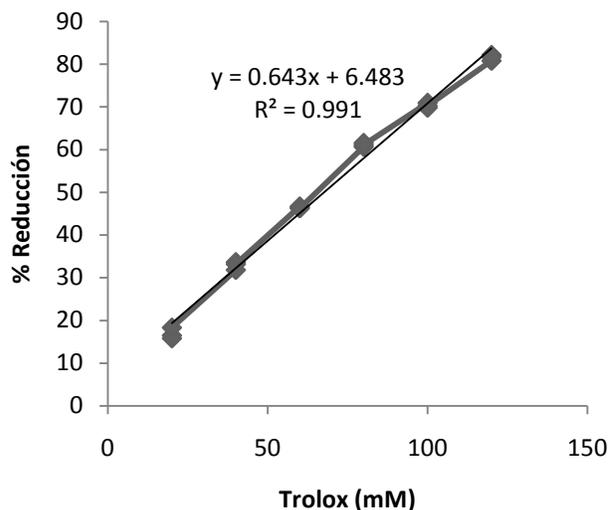


Figura A4 Curva estándar de Trolox para evaluación de reducción de radical DPPH•



---

---

## Apéndice E

Se realizaron curvas estándar para cada día de evaluación del sistema ABTS/lacasa. Se utilizó ácido gálico como referencia, las concentraciones utilizadas se detallan en la tabla A5.

Tabla A5. Curva estándar de Ácido Gálico para evaluación del sistema ABTS/lacasa

<b>Ácido Gálico [mg/L]</b>
18.41
22.09
25.77
29.45
33.13
36.82

Utilizadas para los dos sistemas evaluados: DeniLite IIS y lacasa de *Rhus vernicifera*.

---

---

## Apéndice F

Los resultados de la presente tesis se han presentado en los siguientes foros especializados:

- VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 2009. Celebrado del 6 al 9 de septiembre de 2009 en la ciudad de Bogotá, Colombia, en la modalidad de poster.
- XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, celebrado del 22 al 26 de marzo de 2010 en Acapulco, Guerrero, en la modalidad de poster.
- XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, celebrado del 4 al 7 de mayo de 2010, en Huatulco, Oaxaca, en la modalidad de poster.

Entrevistas en los siguientes medios informativos:

- EL UNIVERSAL. El muérdago: de plaga forestal a fuente natural de antioxidantes. 19 de abril de 2010.
- CEMANAHUAC. Boletín informativo vol. VI, No. 99, Año XIX. Abril 2010. Sección Docencia e investigación. “El muérdago y su utilidad para prevenir el cáncer de mama”.
- SEMANARIO DE LA UAM. Vol. XVI. No. 33. 3 de mayo de 2010. Sección salud. “Identifican científicos de la UAM propiedades anticarcinógenas en planta parasitaria”.