



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la actividad bactericida, citotóxica e insecticida
de *Cladocolea loniceroides* (Van Tieghem) Kujt
(Loranthaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

GISELA ESPERANZA DURÁN RODRÍGUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO**

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Durán
Rodríguez
Gisela Esperanza
56 17 35 53
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
405005734
2. Datos del tutor
Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Patricia
Guevara
Fefer
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Héctor Mario
Benavides
Meza
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Susana
Valencia
Ávalos
6. Datos del sinodal 4
Q. A.
Verónica
Muñoz
Ocotero
7. Datos del trabajo escrito
Estudio de la actividad bactericida, citotóxica e
insecticida de *Cladocolea loniceroides* (Loranthaceae)
63 p
2011

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme esta formación profesional y permitirme realizar este trabajo.

Al Laboratorio de Fitoquímica por proporcionarme un lugar y apoyo para la realización de mi tesis.

A mi tutora la Dra. Josefina Herrera Santoyo, por su apoyo, paciencia, asesoría y consejos en la realización de este trabajo.

A la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero por su apoyo en la realización de las pruebas de actividad bactericida y por la revisión de este trabajo.

A la Dra. Patricia Guevara Féfer, al Dr. Héctor Mario Benavides y a la Dra. Susana Valencia Ávalos por la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz por su apoyo en la obtención de los extractos y en las pruebas de actividad insecticida.

Al Biólogo Enrique Llanos Romero por la asesoría técnica en el manejo del densitómetro para el análisis por cromatografía planar.

Al Biólogo José Reguera por su apoyo en la realización de las pruebas de actividad insecticida.

Dedicatorias

A mis padres por su apoyo y amor incondicional, por haberme dado lo mejor de ustedes, traerme al mundo y creer en mí.

A mis hermanos Pablo y Érika, por su apoyo sobre todo en aquellas tantas noches de desvelo.

A mis amigos de toda la vida: Ana, Caro, Cynthia, Lulis, Ale, Sergio, Marco y Bere, por tantos momentos juntos y porque después de tantos años siguen a mi lado, sin importar si están del otro lado del charco o a la vuelta de la esquina.

A mis amigos de la universidad, por las aventuras que compartimos y las enseñanzas que cada uno me ha brindado, en especial a Carlos (“quique”) quien siempre me hizo reír con su espontaneidad e hizo de los viajes experiencias inolvidables.

A “las chicas”: Abryl, Dianis, Krayo, Luca, Marce, María y Yolo por las aventuras que compartimos dentro y fuera de las aulas, por brindarme su amistad, las quiero mucho.

A Lore, Ale, Lucy y Eva por las pláticas acompañadas de un buen platillo y risas que causan dolor de estómago.

A Jani, por ser Jani y haberte cruzado en mi camino, sin ti jamás hubiera trasnochado en la facultad, aprendido portugués, creído en el destino y lo más importante no sería tan feliz por tener una amiga como tú.

A Jose, Vero, Paty, Eva, Bety, José, Enrique, Karla, Isaac, Lety e Ivette por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar y convertirlo en mi segundo hogar.

Lo importante no es el fin del camino, sino el camino. Quien viaja demasiado aprisa se pierde la esencia del viaje.

Louis L'Amour

Un sueño que sueñas solo es sólo un sueño. Un sueño que sueñas con alguien es una realidad.

John Lennon

ÍNDICE

1	RESÚMEN	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
3	ANTECEDENTES	4
	3.1 Distribución geográfica	4
	3.2 Ubicación taxonómica y descripción de la especie	5
	3.3 Importancia ecológica y económica	7
	3.4 Usos en medicina tradicional	9
	3.5 Antecedentes farmacológicos	11
	3.6 Antecedentes químicos	13
	3.7 Antecedentes de herbivoría.....	14
4	JUSTIFICACIÓN	16
5	OBJETIVOS.....	18
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
	6.1 Diagrama metodológico	19
	6.2 Recolecta de material	20

6.3	Obtención de extractos.....	20
6.3.1	Extractos orgánicos	20
6.3.2	Extractos acuosos	21
6.4	Análisis fitoquímico.....	21
6.4.1	Determinación de grupos de metabolitos secundarios	21
6.4.2	Perfiles cromatográficos.....	23
6.5	Pruebas de actividad biológica	24
6.5.1	Actividad citotóxica	24
6.5.2	Ensayo de actividad bactericida	26
6.5.3	Ensayo con <i>Spodoptera frugiperda</i>	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1	Rendimientos	30
7.2	Análisis fitoquímico.....	32
7.2.1	Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios.....	32
7.2.2	Cromatografía en capa fina	35
7.3	Pruebas biológicas	41
7.3.1	Actividad citotóxica.....	41

7.3.2	Actividad bactericida	47
7.3.3	Actividad antialimentaria	50
8	CONCLUSIONES	55
9	RECOMENDACIONES	57
10	REFERENCIAS	58

1. RESÚMEN

Los “muérdagos” son especies pertenecientes a las familias Loranthaceae y Viscaceae que causan importantes pérdidas económicas, también han sido utilizadas en medicina tradicional para tratar diversos padecimientos como el cáncer. *Cladocolea loniceroides* es una especie endémica y ha ocasionado graves daños al arbolado en distintas ciudades del país, sin embargo, es una fuente prometedora de compuestos con actividad biológica.

Para obtener mayor información de la especie se realizó un estudio preliminar fitoquímico y de actividad biológica de *C. loniceroides*. Se realizaron extractos orgánicos y acuosos de hoja, tallo y flor, a los que se les hizo un análisis fitoquímico preliminar. La actividad biológica fue probada en 4 modelos diferentes: *A. salina*, líneas celulares cancerosas humanas, bacterias y *Spodoptera frugiperda*.

Los resultados mostraron que la principal actividad biológica se registró en las líneas celulares cancerosas, encontrándose en los extractos más activos la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides.

2. INTRODUCCIÓN

El humano ha mantenido, desde el inicio de su existencia, una estrecha relación con las plantas, mediante el método de ensayo y error encontró en ellas, además de satisfacer sus necesidades básicas de alimento, utilidades como el alivio de algunas dolencias. Estos conocimientos han sido transmitidos a través de muchas generaciones, dejando constancia de las plantas útiles o perjudiciales y la manera en que éstas tendrían que ser empleadas (Waizel, 2006).

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de productos de origen vegetal para el tratamiento de enfermedades, para lo cual se han empleado diversos modelos *in vivo* o *in vitro*. Entre éstos se encuentran los ensayos de citotoxicidad como indicadores iniciales en la determinación de una actividad antitumoral; en esta búsqueda se ha probado la actividad antitumoral de un gran número de plantas, entre las cuales figuran especies de la familia Loranthaceae y Viscaceae, también conocidas como “muérdagos” (Waizel *et al.*, 1994).

Los “muérdagos” son plantas que parasitan árboles y arbustos y se les denomina plantas hemiparásitas porque no dependen totalmente de su hospedero, ya que sus hojas tienen clorofila, siendo capaces de producir sus propios carbohidratos; sin embargo, obtienen del hospedero agua, sales minerales y un soporte físico para establecerse (Calder & Bernhardt, 1983). Para obtener las sales y el agua, utilizan un órgano llamado haustorio que introducen en las ramas del hospedero, ocasionando daños irreversibles al árbol tales como deformaciones en las ramas, disminución del follaje y del crecimiento y según el avance de la invasión, aumenta la susceptibilidad a otras infecciones, e incluso le puede causar la muerte (Pérez *et al.*, 2006).

Algunas especies de la familia Loranthaceae se han utilizado en México para tratar distintos padecimientos, por ejemplo, *Cladocolea grahami* para el tratamiento de cáncer (Waizel *et al.*, 1994) y *Arcetobium vaginatum* para enfermedades de origen bacteriano (Hernández, 2009).

Cladocolea loniceroides, especie endémica de México, pertenece a la familia Loranthaceae, razón por la cual es una fuente prometedora de compuestos útiles para el tratamiento de este tipo de enfermedades. Son pocos los estudios acerca de su composición química y de su actividad biológica, y los encontrados son relativos a la taxonomía y al daño que provoca, ya que es un problema fitosanitario en varias ciudades del país, entre ellas la Ciudad de México (Cid-Villamil, 2006; Alvarado *et al.*, 2009).

3. ANTECEDENTES

3.1. Distribución geográfica

La familia Loranthaceae incluye de 60 a 70 géneros con alrededor de 700 especies, y se distribuye en regiones tropicales y subtropicales, sobre todo en el hemisferio sur (Cronquist, 1981; Calder & Bernhardt, 1983).

Un grupo de “muérdagos”, que usualmente eran incluidos como subfamilia dentro de la familia Loranthaceae, actualmente son considerados dentro de la familia Viscaceae, ya que, según estudios recientes, existen diferencias embriológicas, anatómicas y cromosómicas entre este grupo y el resto de las Lorantáceas. Esta familia incluye de 7 a 8 géneros con 350 especies aproximadamente y se distribuye en regiones templadas y tropicales en el hemisferio norte (Cronquist, 1981; Calder & Bernhardt, 1983; Geils & Vázquez, 2002).

El género *Cladocolea* pertenece a la familia Loranthaceae y comprende cerca de 25 especies, de las cuales 19 se encuentran en México distribuidas principalmente en 12 estados (**Figura 1**). También se pueden encontrar especies del mismo género en Centro y Sudamérica (Calderón & Rzedowski, 2001; Alvarado & Saavedra, 2005).

La especie *C. loniceroides* (Van Tieghem) Kuijt es endémica de México. Se ha localizado en los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos, Estado de México, Tlaxcala y en el Distrito Federal (**Figura 1**), (Calderón & Rzedowski, 2001; Cházaro *et al.*, 2005).



Figura 1. Mapa de los estados en los que se encuentran el género *Cladocolea* y la especie *C. loniceroides* en México

3.2. Ubicación taxonómica y descripción de la especie

Según Cronquist(1981):

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Santalales

Familia: Loranthaceae

Género: *Cladocolea*

Especie: *Cladocolea loniceroides* (Van Tieghem) Kuijt

Según el APG III system (Angiosperm Phylogeny Group III system), (2009), la familia Loranthaceae pertenece al orden Santalales, y se incluye en el clado del grupo corona de las eudicotiledóneas (Stevens, 2011).

C. loniceroides es un arbusto hemiparásito, dioico, erecto, de tallos ramificados con pubescencia velutina de 30 a 100 cm de alto. **Hojas** firmes y rígidas pero no coriáceas, alternas u opuestas, subsésiles, ovadas a lanceoladas, de 2 a 5 cm de largo y de 0.5 a 2.5 cm de ancho, ápice agudo a acuminado, borde entero, base por lo común cuneada, venación pinnada. **Inflorescencias** en forma de capítulos axilares de 3 a 10 flores, dispuestos sobre pedúnculos de 0.3 a 2 cm de largo. **Flores** rodeadas por un involucre de varias brácteas linear-lanceoladas, de 3 a 5 mm de largo. Flores femeninas de color blanco, con cálculo de poco menos de 1 mm de largo, tépalos lineares de 2 a 3.5 mm de largo, caducos, estilo sigmoideo a partir de sus dos terceras partes hacia arriba, estigma capitado, algo bilobado, el ovario mide 1 mm, estigma bien diferenciado, androceo reducido. Flores masculinas de 6 a 10 por inflorescencia color blanco-amarillo, cálculo de 1 mm de largo, tépalos oblongo-lanceolados, de 3 a 3.5 mm de largo, estambres adnados a tépalos, las anteras miden menos de 1 mm y en su interior hay dos sacos de polen dispuestos hacia arriba y dos sacos hacia abajo, gineceo rudimentario. **Fruto** ovoide, glabro, carnoso, de color rojo oscuro, de 6 a 8 mm de largo por 4 a 5 mm de ancho, embrión verde oscuro, en forma de clava, cotiledones lineares (Kuijt, 1975; Calderón & Rzedowski, 2001), (**Figura 2**).



Figura 2. *Cladocolea loniceroides* (Van Tieghem) Kuijt, tomado de Cházaro *et al.* (2005)

3.3. Importancia ecológica y económica

Las especies de la familia Loranthaceae parasitan árboles y arbustos de diferentes familias, solo en algunos casos requieren de un hospedero específico. Los individuos que sufren de una grave infección de “muérdago”, generalmente son árboles débiles y que se encuentran en estrés constante, por ejemplo los que se localizan en los bosques urbanos, por lo que la presencia de estas hemiparásitas en dichos lugares representa un grave problema en la salud de los árboles, afectando los beneficios que el bosque urbano proporciona a las ciudades (Pérez *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2008).

A pesar de los daños que ocasionan a los árboles, los “muérdagos” juegan un papel ecológico importante en distintos hábitats alrededor del mundo, principalmente como recurso alimenticio para diferentes especies silvestres o domésticas (aves, mamíferos e insectos) sobre todo en época de sequía cuando el alimento es escaso. Algunas especies de aves se alimentan exclusivamente de frutos de “muérdago” sin importar la época del año. Estas hemiparásitas también proporcionan lugares para anidar y perchas para las aves (Hawksworth, 1996; Watson, 2001).

Algunos ecólogos consideran “los muérdagos” como indicadores del estado de perturbación de un área determinada, ya que en hábitats fragmentados la densidad de estas especies suele estar modificada, y la alta compactación y baja fertilidad del suelo, son factores que favorecen su frecuente aparición (Watson, 2001; Calder & Bernhardt, 1983).

La mayor parte de las Lorantáceas son polinizadas por aves, sobre todo aquellas que tienen flores de colores brillantes (amarillo, anaranjado o rojo), y corolas amplias; sin embargo, algunas son polinizadas por medio del viento o por insectos, siendo las flores de estas especies más pequeñas y de colores menos brillantes. Por otro lado, la dispersión de semillas de estas plantas, se lleva a cabo principalmente por aves frugívoras, ya que los frutos, generalmente de colores conspicuos y ricos en azúcares, son especialmente atractivos para estos vertebrados (Watson, 2001). De esta manera, los “muérdagos” pueden ser dispersados en amplias regiones por medio de aves que recorren grandes distancias, aunque el hombre ha jugado un papel más importante en la dispersión de algunas de estas especies sobre todo en las zonas urbanas, introduciendo árboles infectados de otras regiones (Watson, 2001; Cházaro *et al.*, 2005).

Según Cházaro *et al.* (2005), el género *Cladocolea* tiene alta especificidad por sus hospederos: *C. grahami* y *C. microphylla* sólo parasitan encinos (*Quercus* spp.), mientras que *C. cupulata* se desarrolla mejor en pináceas. Sin embargo, con *C. loniceroides* no sucede así, esta especie no muestra preferencia por un tipo de hospedero (Alvarado *et al.* 2009), infesta árboles de producción frutal, ornamental y forestal, todas potencialmente maderables, incluso puede parasitar otras Lorantáceas, por lo que también se le considera hiperparásita (Cid-Villamil, 2006).

C. loniceroides es el primer “muérdago” documentado que fue introducido accidentalmente a una zona urbana; en 1971 se observó en *Ligustrum spp.* en la ciudad de México, y se cree que estos árboles fueron llevados de un vivero de Cuernavaca, Morelos con la planta hemiparásita (Cházaro *et al.*, 2005).

C. loniceroides parasita aproximadamente 15 especies de árboles en la ciudad de México, y representa un gran problema fitosanitario sobre todo en la zona chinampera de Xochimilco, en donde ha ocasionado daños graves e incluso la muerte de especies de tal importancia como *Salix bonplandiana* conocido popularmente como “ahuejote” (Pérez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2009).

A pesar de que *C. loniceroides* causa importantes pérdidas en el arbolado urbano, el único manejo que se le da para evitar la propagación de esta especie, es por medio de podas continuas, lo cual se debe en gran parte a la falta de investigación sobre otras estrategias como el uso de clones o materiales resistentes y el control biológico (Alvarado & Saavedra, 2005).

3.4. Usos en medicina tradicional

Desde la antigüedad, los druidas consideraban a los “muérdagos” como plantas sagradas, debido a que durante el invierno, mientras las ramas de los robles no tenían hojas, el “muérdago” permanecía verde y florecía sin tener raíces en la tierra; de esta manera, estas plantas representaban la vida eterna. Creían que el “muérdago” era un antídoto contra algunos venenos, que aseguraba la fertilidad y que poseía otras propiedades milagrosas para curar diversas enfermedades (Büssing, 2000).

A lo largo de la historia, los “muérdagos” han tenido distintas aplicaciones en la medicina tradicional. Hipócrates lo utilizaba para tratar enfermedades del bazo y dolores menstruales, uso que se le dio durante varios siglos. Posteriormente, en la Edad Media, se utilizó para tratar enfermedades del hígado, bazo y riñones, así como epilepsia, infertilidad en mujeres y úlceras. Durante el siglo XVIII se utilizó contra “la debilidad del corazón” y edema, sin embargo, en el

siglo siguiente, su uso como remedio fue rechazado por los científicos de la época. Fue hasta el siglo XX en que se volvió a tener interés en el estudio de los “muérdagos” para su aplicación medicinal, principalmente con investigaciones de los efectos en la presión sanguínea de los extractos de *Viscum album* (Viscaceae), (Büssing, 2000).

Actualmente, los “muérdagos” son utilizados con fines medicinales en poblaciones rurales de todo el mundo. En India, algunas tribus utilizan *Dendrophthoe falcata* para evitar la infección de heridas, problemas menstruales, asma, desórdenes psíquicos y tuberculosis (Pattanayak & Sunita, 2008). En Nigeria se utiliza *Loranthus micranthus* en decocción o como extracto alcohólico para el tratamiento de epilepsia, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, síndrome menopáusico, infertilidad, reumatismo, como agente antiespasmódico, antimicrobiano y modulador del sistema inmune (Ogoamaka & Ogechukwu, 2009).

En Argentina se utilizan los tallos y hojas de *Ligaria cuneifolia* en infusión como remedio contra la hipertensión; popularmente, esta especie se considera como sustituto de la especie europea *V. album* (Fernández *et al.*, 1998). Especies del género *Struthanthus*, se utilizan en América del sur para calmar el dolor en general, fiebre, desórdenes respiratorios, erupciones y heridas en la piel (Vieira *et al.*, 2005).

En la región del Amazonas, las poblaciones cerca del Río Negro, utilizan las hojas de *Cladocolea micrantha* como terapia contra diversos tipos de tumores y procesos inflamatorios, preferentemente aquellos especímenes que crecen parasitando a *Anacardium occidentale*, “anacardo” o “marañón” (Guimarães *et al.*, 2007).

En México se han utilizado algunas Lorantáceas para el tratamiento de ciertas enfermedades, por ejemplo, según Kuijt (1969), los mayas utilizaban preparaciones con “muérdago” para el tratamiento del cáncer. Actualmente, los indígenas Tepehuanes de Durango, utilizan en decocción las especies de “muérdago” enano *Arcetobium vaginatum* y *A. globosum* para el tratamiento de reumatismo, enfermedades gastrointestinales, desórdenes nerviosos, pulmonares y reumáticos (Hawksworth, 1996). Por otro lado, *Phoradendron tamaulipense* se utiliza en Tamaulipas mezclada con chile como ungüento para disminuir el dolor en general y

Psittacantus calyculatus, conocida en Chiapas como “Chujquén”, se utiliza para bajar la presión arterial y para el tratamiento de la arterioesclerosis (Martínez, 1993).

3.5. Antecedentes farmacológicos

Los extractos del “muérdago” europeo *Viscum album* (Viscaceae) son populares en Europa por su uso como inmunomoduladores (sustancias que modulan la actividad del sistema inmune disminuyendo la respuesta inflamatoria) para el tratamiento del cáncer. Este tratamiento fue introducido hace poco más de 80 años como terapia alternativa por Rudolf Steiner y desde entonces, las evaluaciones clínicas del “muérdago” como adjuvante en terapia anticáncer se ha expandido por distintas partes del mundo (Büssing, 2000; Cerdá *et al.*, 2005).

Investigaciones recientes han confirmado que los extractos de *V. album* inducen apoptosis en células cancerígenas y linfocitos *in vitro*, estimulan el sistema inmune y protegen el ADN contra quimioterapia y radiación (Büssing, 2000).

Por otro lado, en la familia Loranthaceae se han reportado acciones farmacológicas como actividad citotóxica, hipertensiva, antibacteriana, antiviral, hematostática, diurética y antihepatotóxica (Zee Cheng, 1997).

En *Dendrophthoe falcata*, se ha demostrado que el extracto etanólico tiene una fuerte actividad antimicrobiana y antioxidante, además de favorecer la curación de heridas. De acuerdo al estudio fitoquímico de la especie, se dedujo que la actividad antimicrobiana se debe a la presencia de aceites naturales, flavonoides y terpenos. En cuanto a su actividad antioxidante, ésta se le atribuye a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto etanólico (Pattanayak & Sunita, 2008).

Para la especie *Loranthus micranthus* se ha reportado actividad antidiabética, antimicrobiana, antioxidante y antihipertensiva (Ogoamaka *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha reportado que las infusiones de *Ligaria cuneifolia* disminuyen la presión sanguínea, tienen un efecto modulador en la proliferación de células activadas (como las que se encuentran en los tumores) y aumentan la producción de óxido nítrico en los macrófagos, lo que se traduce como efectos inmunomoduladores (Fernández *et al.*, 1998). De esta misma especie, se han evaluado las actividades antiproliferativa y proapoptótica de los flavonoides provenientes de tres fracciones del extracto metanólico de hoja: acuosa, metanólica y de acetato de etilo, siendo la fracción de acetato de etilo la más activa (Cerdá *et al.*, 2005).

En especies que se localizan en América, como *Tripodanthus acutifolius*, *Psittacanthus cuneifolius* y *Struthanthus vulgaris*, se ha reportado que las infusiones, cocciones y tinturas, tienen actividad bactericida tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas (Vieira *et al.*, 2005; Soberón *et al.*, 2006). Se ha demostrado que este tipo de actividad en la especie *Phthirusa pyrifolia* se debe a las lectinas presentes en las hojas (Costa *et al.*, 2010).

Los extractos hexánicos y metanólicos de diversos órganos de las especies mexicanas *Cladoclea grahami*, *Phoradendron reichenbachianum* y *Phoradendron galeotti* fueron probados sobre cultivos de carcinoma de ovario, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de cérvix de células escamosas, carcinoma de colon y leucemia murina. De estos estudios, se registró actividad citotóxica solamente en los extractos hexánicos, sugiriendo que la actividad en estas especies se encuentra en compuestos no polares, además, la especie con los más altos índices de citotoxicidad fue *C. grahami* (Waizel *et al.*, 1994).

Con respecto a *C. loniceroides*, en un estudio realizado por Serrano (2010), se probó la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos de hoja, tallo y fruto mediante la inhibición de lipoperoxidación en ratas. También se determinó que el extracto acuoso de fruto tuvo un efecto citotóxico sobre la línea celular ZR-75 de cáncer de mama ductal humano.

3.6. Antecedentes químicos

Tanto en la familia Loranthaceae como en la familia Viscaceae se han caracterizado compuestos que reducen o modulan el crecimiento de tumores, tales como lectinas, viscotoxinas, lactonas sesquiterpénicas, proteínas, péptidos, oligosacáridos, alcaloides, compuestos polifenólicos y en un gran número de Lorantáceas, flavonoides (Zee Cheng, 1997). Se ha sugerido que algunas lectinas de los muérdagos son parte de un sistema de defensa contra insectos, bacterias y hongos (Costa *et al.*, 2010).

En *Scurrula atropurpurea*, especie de la familia Loranthaceae, parásita de *Thea sinensis*, también se han detectado flavonoides como epicatequina, catequina, aviculina, quercetina y rutina (quercetina en su forma glicosilada), además de ácidos grasos (linoleico y oleico), alcaloides (teobromina y cafeína) y monoterpenos glicosilados (icarisida B₂), (Ohashi *et al.*, 2003).

Fernández *et al.* (1998) detectaron en *Ligaria cuneifolia* la presencia de tiramina en tallos y hojas, una amina que puede causar migraña en algunas personas, y según otros estudios, la concentración de dicho compuesto se ve afectada por el tipo de hospedero. También se han detectado flavonoides como quercetina, catequina, epicatequina, catequin-4-β-ol y avicularina (Cerdá *et al.*, 2005), así como también los triterpenos pentacíclicos betulina y ácido betunílico, compuestos cuya actividad antiinflamatoria, anticancerígena y anti-VIH ha sido probada (Fusco *et al.*, 2004).

En el extracto de hoja de *Struthantus vulgaris* se han identificado flavonoides, saponinas, taninos condensados y proantocianidinas; según Marles *et al.* (2003) citado en Vieira *et al.* (2005) estas últimas, actúan como agentes de protección en la prevención de infecciones en el tracto urinario y debido a su acción antioxidante, en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

En estudios fitoquímicos preliminares de *Loranthus micranthus*, se detectó la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenos, glicósidos, saponinas y resinas en el extracto metanólico-acuoso de hoja. En *L. parasiticus* se ha reportado la presencia de quercetina (Ogoamaka *et al.*, 2009).

Wahab *et al.* (2010) detectaron la presencia de terpenoides, antraquinonas y alcaloides en tres géneros distintos de la familia Loranthaceae: *Tapinanthus*, *Globimetula* y *Phragmanthera*, sin embargo, también observaron una variación en la presencia y concentración de algunos de estos compuestos en individuos de la misma especie recolectados en distintos hospederos.

En los “muérdagos” *Cladocolea grahami*, *Phoradendron reichenbachianum* y *Phoradendron galeotti*, se detectaron alcaloides y terpenos en extractos hexánicos de distintos órganos, mientras que en los extractos metanólicos se encontraron flavonoides, terpenos, glicósidos y taninos (Waizel *et al.*, 1994).

Ríos y Aguilar (2004) aislaron tres triterpenos del extracto de acetona de *C. grahami*: 3 β -palmitoxi-7 β -hidroxilino-12-eno, con su producto de hidrólisis 3 β ,7 β -dihidroxilino-12-eno y 3 β -*sn*-glicerol-(1’-palmitoxi)urs-12-eno, además de los compuestos aislados anteriormente en esta especie: α -amirina, β -amirina, lupenona, lupeol, ácido ursólico, ácido oleanólico, catequina, β -sitosterol y β -sitosteryl- β -D-glucopiranosas.

Con respecto a *C. loniceroides* se ha observado que a medida en que se desarrolla el fruto, se depositan taninos en cada una de las capas que se van formando. En los tejidos que rodean al endospermo se han identificado lípidos, taninos y carbohidratos de tipo mucilaginoso (Alvarado & Saavedra, 2005). Se ha identificado la presencia de polifenoles en extractos acuosos y metanólicos de hoja, tallo y fruto, de los cuales una pequeña parte son flavonoides (Serrano, 2010).

3.7. Antecedentes de herbivoría

Al parecer, las especies de las familias Loranthaceae y Viscaceae “tienen pocas defensas químicas contra depredación, sin embargo, no se ha observado ataque intenso causado por insectos” (Hawksworth, 1996; Watson, 2001). Los muérdagos atraen artrópodos debido a que les proporcionan un microambiente distinto al de las ramas del árbol, lo que es aprovechado por aves insectívoras para obtener alimento (Shaw *et al.*, 2004).

En “muérdagos” enanos (*Arcetobium* spp.) se han observado distintas especies de insectos generalistas alimentándose de ellos, aunque algunos de los órdenes Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera y Thysanoptera se alimentan únicamente de especies pertenecientes a este género (Watson, 2001; Shaw *et al.*, 2004).

Una especie de mosca de la fruta, *Cerapitella loranthe*, coloca sus huevecillos en los frutos de “muérdago” para que las larvas se alimenten de éste destruyéndolo y de esta manera evitan su propagación (Reid *et al.*, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN

Las especies de la familia Loranthaceae son de gran importancia ecológica, ya que interactúan con distintas especies animales y vegetales. Estas plantas, al ser hemiparásitas son nocivas para sus hospederos y pueden afectar la salud de los bosques; sin embargo, su presencia es importante ya que son un recurso alimenticio para diversas especies de insectos, aves e incluso mamíferos.

Las especies de la familia Loranthaceae alteran la calidad de la madera, reduciendo su producción y en las zonas urbanas, disminuyen los beneficios que los árboles proporcionan en estos lugares. Sin embargo, también pueden ser útiles, ya que distintas especies de esta familia se han utilizado desde tiempos antiguos con fines medicinales tanto en México como en distintas partes del mundo, convirtiéndose en un recurso importante principalmente en poblaciones con tradición en el uso de plantas útiles, por lo que se han realizado estudios farmacológicos de distintas especies de Lorantáceas, reportando en ellas actividades antitumoral principalmente, citotóxica y bactericida entre otras, comprobando científicamente sus efectos curativos.

Es importante realizar el análisis químico y de actividad biológica de especies de esta familia como *C. loniceroides*, ya que, además de formar parte de un ecosistema y ser un recurso clave en él, son una fuente potencial de compuestos biológicamente activos.

La especie endémica *C. loniceroides* parasita aproximadamente 15 especies de árboles tan sólo en la capital del país, por lo que es un grave problema fitosanitario. A pesar de ser una especie abundante en el valle de México, existen pocos estudios acerca del ciclo de vida, anatomía, ecología, fisiología, composición química y actividad biológica de la especie (Alvarado *et al.*, 2009).

Con la intención de contribuir al conocimiento acerca de la especie, así como de correlacionar el uso medicinal de otras especies de la familia Loranthaceae con *C. loniceroides*, se realizó un estudio químico y de actividad biológica para determinar si la especie presenta compuestos potencialmente útiles en el tratamiento de distintas enfermedades que afectan a la

población tales como el cáncer o algunas enfermedades de origen bacteriano, posibilitando el uso de este hemiparásito en beneficio de la salud humana. Además, debido a la observación de campo de una ausencia de ataque de insectos, también se probó su posible efecto insecticida y antialimentario.

En el presente trabajo se realizaron extractos orgánicos y acuosos de hoja, tallo y flor de *C. loniceroides* con los que se llevaron a cabo diversos bioensayos para determinar de forma preliminar la actividad citotóxica, antibacteriana, insecticida y antialimentaria de la especie.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Realizar un estudio preliminar fitoquímico y de actividad biológica de hoja, tallo y flor de *Cladocolea loniceroides*.

5.2. Objetivos particulares

- Obtener los compuestos que la especie produce de acuerdo a su polaridad mediante una extracción selectiva.
- Detectar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en los extractos obtenidos.
- Realizar un análisis cromatográfico de dichos extractos.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos en *Artemia salina* y en líneas celulares cancerosas humanas.
- Evaluar la actividad bactericida de los extractos en bacterias Gram positivas y en bacterias Gram negativas.
- Evaluar la actividad insecticida (antialimentaria) de los extractos en *Spodoptera frugiperda*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diagrama metodológico

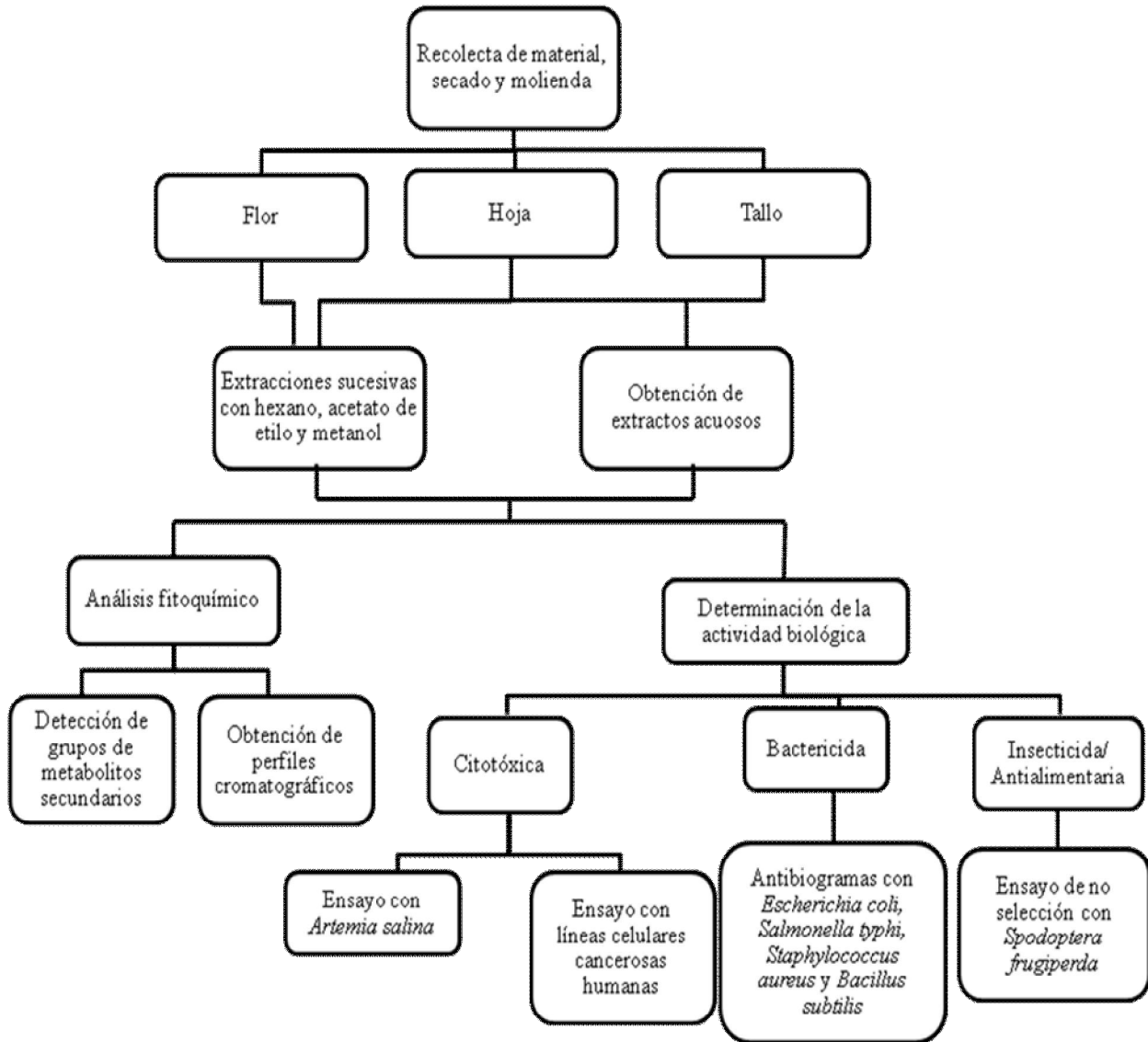


Figura 3. Diagrama de las actividades realizadas en el presente trabajo, las cuales se describen en las páginas siguientes.

6.2. Recolecta de material

El material vegetal fue recolectado e identificado en Marzo del 2009 en Calzada del Hueso, delegación Tlalpan por la Bióloga Ma. Teresa Cantoral, encargada del Centro de Manejo Fitosanitario para las Áreas Verdes Urbanas del Distrito Federal, CEMFAV.

El material fue secado a temperatura ambiente y posteriormente se molieron por separado hojas, flores y tallos.

6.3. Obtención de extractos

Una vez molido el material, se pesaron 100 g de cada órgano, se colocaron por separado en matraces Erlenmeyer y se etiquetaron.

6.3.1. Extractos orgánicos

Extracción hexánica

En cada matraz se colocó la cantidad suficiente de hexano para cubrir el material vegetal y se dejó en maceración 48 h en agitación constante. Posteriormente, los extractos se filtraron y se destilaron a presión reducida en un rotavapor para concentrarlos. Enseguida se trasvasaron en viales con sus etiquetas correspondientes y se dejaron sin tapar para permitir la evaporación del disolvente. Este procedimiento se repitió dos veces más.

Extracción con acetato de etilo

Una vez realizada la extracción hexánica, el material vegetal se maceró nuevamente pero esta vez con acetato de etilo por 48 h en agitación constante. Los extractos obtenidos se filtraron, se destilaron en el rotavapor y se colocaron en viales etiquetados dejándolos destapados para permitir la evaporación del disolvente. El procedimiento se realizó dos veces más.

Extracción metanólica

Al finalizar la extracción con acetato de etilo, el material se sometió a extracción con metanol, fue filtrado y destilado de la misma manera que en las extracciones anteriores. Los extractos que se obtuvieron se colocaron en viales etiquetados y se colocaron en una cámara con vacío para hacer más rápida la evaporación del disolvente.

6.3.2. Extractos acuosos

Del material molido de hoja y tallo, se pesaron 10g de cada órgano y se sometieron a maceración con agua durante 24 h por separado. Una vez transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y se liofilizaron. El material liofilizado se almacenó en frascos con su etiqueta correspondiente dentro de una cámara desecadora.

Se obtuvo el peso de todos los extractos para calcular los rendimientos.

6.4. Análisis fitoquímico

6.4.1. Determinación de grupos de metabolitos secundarios

Se realizaron pruebas para detectar la presencia de alcaloides, glucósidos, flavonoides y terpenos-esteroides. Para llevarlas a cabo, de cada extracto se prepararon 10 mL de una disolución madre a una concentración de 5 mg/mL y se distribuyó 1 mL en cada uno de los 5 tubos de ensayo. Los extractos hexánicos y de acetato de etilo se disolvieron en cloroformo y los extractos metanólicos y acuosos se disolvieron en una parte de agua por cada cuatro de metanol.

Las pruebas de detección se realizaron de acuerdo a la metodología que Domínguez (1973) describe:

Prueba de alcaloides, reactivo de Dragendorff

Se evaporó el disolvente de las muestras, éstas se disolvieron nuevamente con ácido clorhídrico (HCl) al 1%. A cada muestra se le agregaron dos gotas del reactivo de Dragendorff. El resultado es positivo si se observa la formación de un precipitado anaranjado.

Prueba de alcaloides, reactivo de ácido silicotúngstico

Las muestras se prepararon como se menciona en la prueba anterior, pero en lugar de dos gotas de reactivo de Dragendorff, se agregaron dos gotas del reactivo de ácido silicotúngstico a cada muestra. La prueba se consideró positiva si se formó un precipitado beige.

Prueba de terpenos y esteroides, reactivo de Liebermann-Burchard

Primero se elaboró el reactivo de la siguiente manera: en un matraz se colocó el mismo volumen de anhídrido acético y de cloroformo, y por cada mililitro de cloroformo se le agregó a esta mezcla una gota de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Por otro lado, se llevaron a sequedad las muestras de los extractos metanólicos y acuosos. Una vez secas se disolvieron en cloroformo. Enseguida se colocaron todas las muestras en un baño de hielo y a cada una se le agregó 1 mL del reactivo de Liebermann-Burchard. La coloración verde-azul o rojiza, indica la presencia de terpenos-esteroides.

Prueba de flavonoides, reactivo de Shinoda

Todas las muestras se evaporaron. Los extractos no polares fueron disueltos en etanol, mientras que los polares se disolvieron en metanol. Posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 1 trozo de magnesio (Mg) y 2 gotas de HCl concentrado. El viraje de la coloración en la disolución al terminar la reacción determinó la presencia de flavonoides.

Prueba de glicósidos, reactivo de Mölich

Las muestras se prepararon de manera similar que para el reactivo de Shinoda. Una vez disueltas en alcohol, a cada muestra se le agregaron 2 gotas de una solución al 5% de α -naftol en etanol y 1 mL de H_2SO_4 concentrado. El ácido se añadió por las paredes del tubo para evitar una reacción violenta y permitir la aparición de un anillo en la interfase. La prueba fue considerada positiva si el anillo formado presentó una coloración púrpura.

6.4.2. Perfiles cromatográficos

Para obtener los perfiles cromatográficos, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina. Las placas utilizadas tenían base de gel de sílice con indicador de fluorescencia UV 254 nm en soporte de vidrio.

En primer lugar, se prepararon disoluciones de cada extracto a una concentración de 5 mg/mL, y con ayuda de un aplicador automático (CAMAG automatic TLC sampler 4) se colocaron en las placas bandas de 5 mm de ancho con 15 μ L de cada disolvente.

Los extractos hexánicos y de acetato de etilo se aplicaron por separado en placas de 5 x 5 cm y se desarrollaron en una cámara cromatográfica circular de 6.5 cm de diámetro x 10.5 cm de largo.

Posteriormente, en 2 placas de 7 cm de ancho por 5 cm de alto, se aplicaron los extractos metanólicos y acuosos. Estas placas fueron desarrolladas en una cámara de cromatografía de 20 x 15 x 5 cm.

Todas las placas fueron observadas en un gabinete con luz ultravioleta con longitud de onda larga (365 nm).

A continuación se revelaron con reactivo de Liebermann-Burchard, modificado para rociar, que pone de manifiesto la presencia de terpenos, a excepción de una placa con extractos polares, la cual fue revelada con revelador de productos naturales RPN (2-aminoetil difenilborato), que pone de manifiesto la detección de flavonoides principalmente.

6.5. Pruebas de actividad biológica

6.5.1. Actividad citotóxica

Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos, se realizaron dos pruebas: en una se utilizó el método de Meyer *et al.* (1982) para calcular los valores LC_{50} de compuestos activos frente a *Artemia salina*, y la otra con líneas celulares cancerosas humanas por el método de tinción de proteínas con sulforodamina B (SRB) para medir la viabilidad y el crecimiento celular (Skehan *et al.*, 1990).

Ensayo con *Artemia salina*

Se colocaron aproximadamente 0.5 g de quistes de *A. salina* marca *NovoTemia* en un frasco ámbar con una solución salina de 1.022 g/mL de salinidad dentro de una incubadora a 27 °C con aireación durante 24 horas, condiciones para favorecer la eclosión de los nauplios.

Por otra parte, de cada extracto se prepararon disoluciones con concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, se colocó 1 mL de cada una en distintos tubos de ensayo y se evaporó el disolvente a excepción de los extractos acuosos, cuyas disoluciones se prepararon con solución salina. Se hicieron cinco repeticiones por concentración.

A los tubos con extracto orgánico, se les añadieron 10 mL de solución salina, mientras que a los que tenían extracto acuoso se les añadieron 9 mL.

Por cada tratamiento se prepararon 5 tubos control, en los cuales se colocaron 10 ml de solución salina. Para los tratamientos de los extractos orgánicos, se utilizó un control más, el cual consistió en colocar 1 mL del disolvente correspondiente al tratamiento, se dejó secar y posteriormente se añadieron 10 mL de solución salina para descartar la presencia de contaminantes en los disolventes.

Para disolver los extractos hexánicos y de acetato de etilo en la solución salina, fue necesario añadir a cada tubo 0.2 mL de vehículo (tween al 0.1%). Por esta razón, en los dos tratamientos se utilizó un control extra: 10 mL de solución salina con 0.2 mL de tween.

Una vez que eclosionaron los nauplios, se colocaron 10 en cada tratamiento y enseguida se introdujeron en una incubadora a 27°C; después de 24 h se contaron los sobrevivientes.

Ensayo con líneas celulares cancerosas humanas

Este ensayo se realizó en el Instituto de Química en el Laboratorio de pruebas biológicas. Se utilizó el método de tinción de proteínas con sulforodamina B (SRB), (Skehan *et al.*, 1990) para medir la viabilidad y el crecimiento celular en 6 líneas celulares cancerosas humanas: glía de sistema nervioso central (U-251 Glio), próstata (PC-3), leucemia (K-562 CML), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1).

En primer lugar las células fueron inoculadas en medio RPMI-1640 con 10% de suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 IU/mL, sulfato de estreptomina 100 µg/mL y anfotericina B (Gibco) 0.25 µg/mL y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Para el ensayo se preparó una suspensión de cada tipo de células con 0.1 % EDTA-tripsina y de cada suspensión se inocularon en platos de microtitulación con 96 pozos, 100 µL por pozo y se incubaron por 24 horas.

Enseguida los extractos orgánicos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) 40 mM y los acuosos en agua, después se diluyeron en los medios de cultivo a una concentración de 50 µg/mL

de extracto. Por otro lado, se preparó un control positivo con doxorubicina. En cada pozo se colocaron 100 µl de los distintos tratamientos y se dejaron incubar 48 h.

Una vez transcurrido este tiempo, se fijaron las proteínas de las células sobrevivientes agregando 50 µl de ácido tricloroacético al 50% (p/v) y se incubaron por 60 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue desechado, los platos fueron lavados tres veces con agua y se dejaron secar por 24 h. A continuación, en cada pozo se colocaron 100 µl de solución de sulforodamida B (SRB) (4% p/v en 1 % de ácido acético) y se dejaron 30 minutos para teñir las proteínas fijadas. El sobrante de SRB fue eliminado con ácido acético al 1 % y las proteínas teñidas fueron solubilizadas con tris [hidroximetil] aminometano 10 mM. Las densidades ópticas de estas suspensiones fueron leídas en un espectrofotómetro automatizado a una longitud de onda de 515 nm. La supervivencia de las células se midió con base en el número de proteínas fijadas.

6.5.2. Ensayo de actividad bactericida

Para evaluar la actividad bactericida, se utilizó el método de difusión con disco en agar (Bauer *et al.*, 1966). El material requerido se esterilizó en la autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 120°C y una presión de 1.5 psi y se trabajó en una campana de flujo laminar para crear un ambiente estéril.

Preparación de antibiogramas

Se realizaron 4 disoluciones a distintas concentraciones por extracto: 25, 50, 100 y 200 µg/µL y en seguida se impregnaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro con 20 µL de cada una de estas disoluciones. Se hicieron tres repeticiones por concentración. Una vez impregnados, se permitió la evaporación del disolvente.

Preparación de cultivos sólidos bacterianos

Se inocularon cepas de las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* en caldo nutritivo por 48 h.

Una vez transcurrido este tiempo, se ajustó la turbidez de los cultivos de acuerdo al estándar de Mc Farland, el cual consistió en una solución de 0.5 mL de cloruro de bario (BaCl_2) al 1% y 99.5mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.36 N; el BaCl_2 forma un precipitado en presencia de H_2SO_4 , causando una turbidez equivalente a una densidad de 1.5×10^8 bacterias/mL (Bauer *et al.*, 1966).

Se preparó un medio de cultivo sólido para cada bacteria, se esterilizó y se distribuyó en 4 matraces Erlenmeyer. Una vez que el medio tuvo una temperatura entre 45° y 50° C, se le agregó el inóculo de bacteria ajustada en una relación de 1:10 (v/v). En seguida se vació el contenido de los matraces en cajas Petri y se dejó solidificar.

Una vez que los cultivos se solidificaron, se colocaron los discos dejando un espacio entre uno y otro de 2 cm, tal como se muestra en la **Figura 4**.

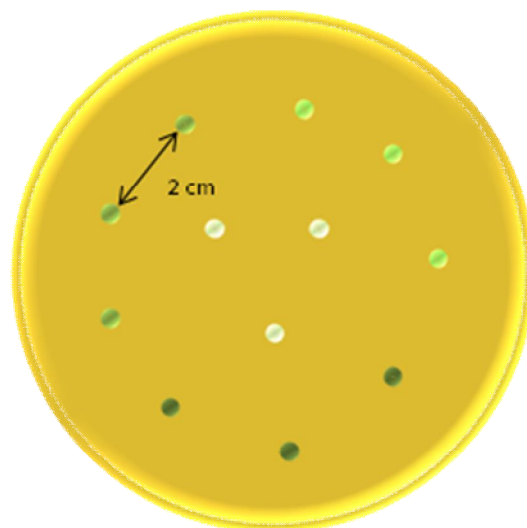


Figura 4. Diagrama que representa la forma en que se colocaron los discos impregnados con extracto; los tonos de verde indican la cantidad de extracto en cada disco, del más claro al más oscuro: 500, 1000, 2000 y 4000 μg .

Posteriormente, las cajas se incubaron a 37° C por 18 h. Pasado este tiempo, se hizo una primera lectura para observar si hubo actividad, la cual se determinó por la formación de anillos hialinos alrededor de los discos. Se midió el diámetro de los anillos hialinos formados. Las cajas se volvieron a meter a la incubadora y 6 h después, se realizó una segunda lectura para observar si los anillos que se formaron seguían presentes o se habían cerrado y si continuaban del mismo tamaño. Esto se hizo con el objetivo de corroborar si el extracto tuvo actividad bactericida o bacteriostática y se determinó la mínima concentración inhibitoria (MCI), aquella concentración más baja a la que se presentó inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco tratado (Bauer *et al.*, 1966).

6.5.3. Ensayo con *Spodoptera frugiperda*

Se probaron solamente los extractos orgánicos de hoja y de tallo. El ensayo fue de no selección con larvas de *S. frugiperda* en el tercer estadio de desarrollo (Koul, 2005). Para asegurar la alimentación de las larvas durante el ensayo, se sometieron a un ayuno de 5 h.

Primero se cortaron discos de hoja de lechuga orgánica marca eva® de 2 cm de diámetro y se prepararon diluciones de los extractos orgánicos de hoja y tallo con concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, de las cuales se colocaron 100 µL en cada disco y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Los controles consistieron en colocar en los discos 100 µL del disolvente correspondiente a la polaridad del extracto. Se utilizaron 20 discos por tratamiento.

Por otro lado, se preparó el medio con agar para que las larvas pudieran desplazarse, y se colocó en cajas Petri. Una vez solidificado, se le hicieron cuatro horadaciones de poco más de 2 cm de diámetro para colocar dentro de ellas los discos, de tal forma que se tuvieran cinco réplicas para cada tratamiento, cada una con 4 discos foliares. En seguida se introdujo una larva en cada caja (**Figura 5**).

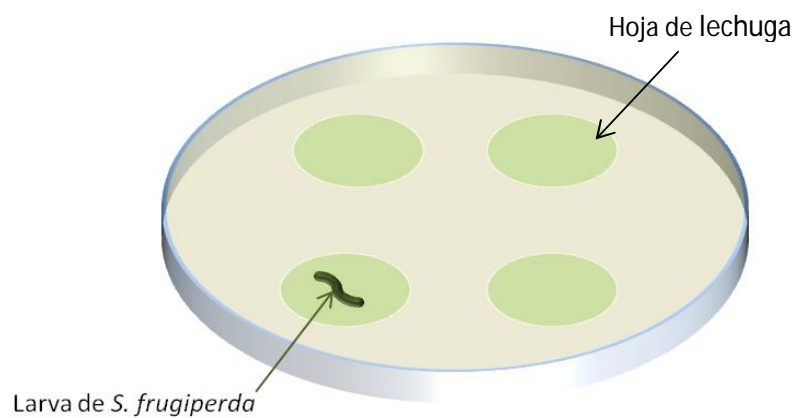


Figura 5. Representación del montaje de los extractos de tallo y hoja.

Las cajas se colocaron en una incubadora a una temperatura de 26 °C por 18 h. Transcurrido este periodo, se midió el área foliar consumida de cada disco con ayuda de un escáner, y de esta manera se evaluó la actividad antialimentaria.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se obtuvieron 9 extractos orgánicos y 2 acuosos de *C. loniceroides* que se describen a continuación:

- 3 de baja polaridad(hexánicos): tallo, hoja y flor
- 3 de mediana polaridad (de acetato de etilo): tallo, hoja y flor
- 3 polares(metanólicos): tallo, hoja y flor
- 2 acuosos: tallo y hoja

7.1. Rendimientos

Una vez obtenidos los extractos, se calculó el rendimiento de cada uno. En la **Figura 6** se observa que los extractos con mayor rendimiento fueron los acuosos, siendo el más abundante el de hoja (20%) y después el de tallo (13%).

Los que siguieron en abundancia fueron los metanólicos: el de mayor rendimiento fue el de tallo (11%), después el de flor (9%) y en seguida el de hoja (5%). Posteriormente, de los hexánicos, el más abundante fue el de flor (7%) seguido por el de hoja (3%) y por último el de tallo (1%). Finalmente, los extractos de menor rendimiento fueron los de acetato de etilo en el siguiente orden: tallo (1.3%), flor (1.1%) y hoja (0.9%).

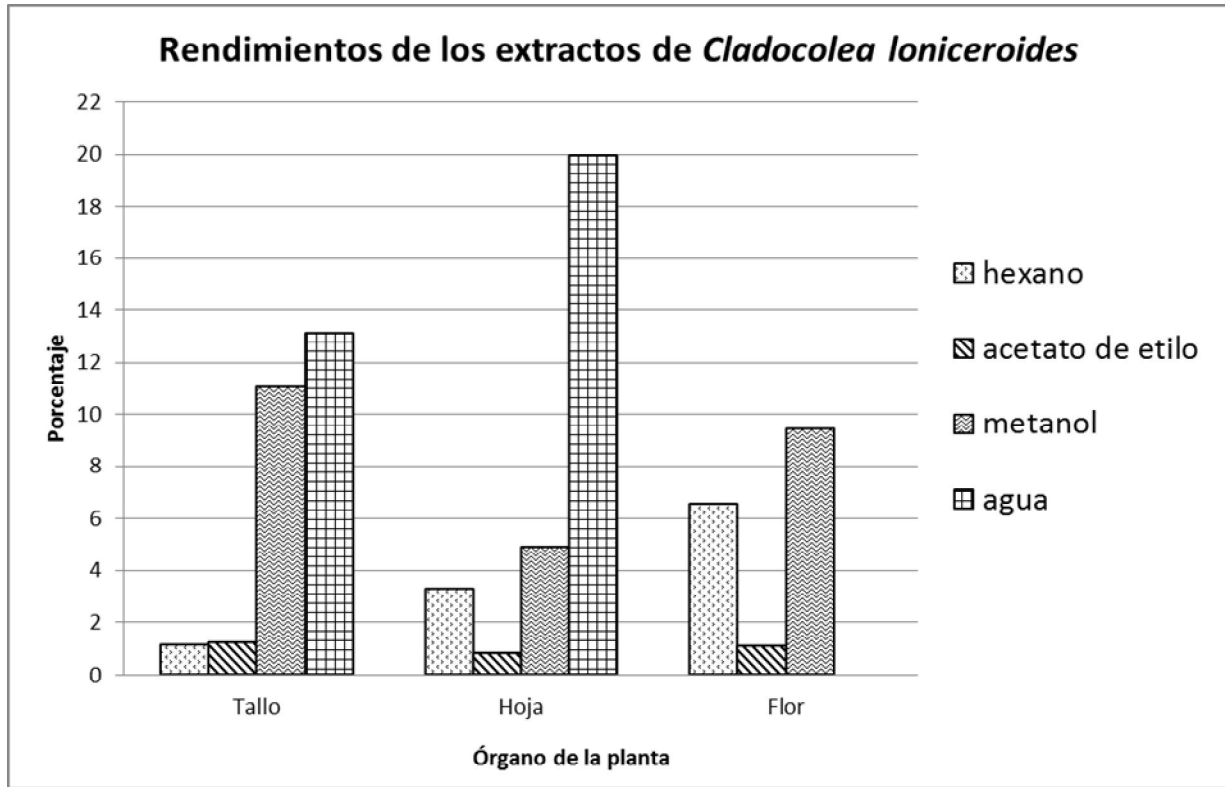


Figura 6. Rendimientos de los extractos de tallo, hoja y flor por cada 100g de planta molida.

Cada órgano de la planta tuvo una variación de rendimientos en función del disolvente utilizado en la extracción. Esto se debe en gran parte a las funciones y a la estructura de cada órgano de la planta, por lo tanto, la cantidad y la concentración de metabolitos secundarios se ve modificada.

Es importante considerar que de acuerdo a las condiciones de desarrollo y de recolecta de la planta, los rendimientos pueden variar, ya que la producción de metabolitos secundarios es afectada por varios aspectos, principalmente por las condiciones del hospedero, la luz que recibe, el estrés biótico y abiótico al que pueda estar sometida la especie hemiparásita (Press *et al.*, 1995; Karban, 1997).

7.2. Análisis fitoquímico

7.2.1. Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios

Los resultados acerca de las pruebas indicaron la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides en los extractos hexánicos y de acetato de etilo; y alcaloides, flavonoides y glicósidos en los extractos metanólicos y acuosos (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Resultados de las pruebas para determinar grupos de metabolitos secundarios

	Reactivo utilizado				
	Dragendorff	Ácido silicotúngstico	Liebermann-Burchard	Shinoda	Mölich
Extracto	Metabolitos secundarios detectados				
	Alcaloides		Terpenos-esteroides	Flavonoides	Glicósidos
Hexánico de tallo	-	-	++ (verde)	+ (verde)	-
Hexánico de hoja	-	-	++ (verde)	+ (verde)	-
Hexánico de flor	-	-	+ (verde)	-	-
Acetato de etilo de tallo	-	-	+++ (verde)	+ (verde)	-
Acetato de etilo de hoja	-	-	++++ (verde)	++ (verde)	-
Acetato de etilo de flor	-	-	++ (verde)	+ (verde)	-
Metanólico de tallo	+	+	-	lig + (rosa)	+++
Metanólico de hoja	Lig +	+	-	++ (rojo)	++
Metanólico de flor	-	Lig+	-	+ (rosa)	++
Acuoso de tallo	Lig +	+	-	lig + (rosa)	++
Acuosos de hoja	Lig +	++	-	lig + (rosa)	++

- = Negativo

Lig += ligeramente positivo

+ = positivo, la cantidad de cruces representa la intensidad de la reacción

Extractos hexánicos

La reacción para identificar terpenos y esteroides (Liebermann-Burchard) dio como resultado una coloración verde en los extractos de los diferentes órganos, sin embargo, hubo diferencias en la intensidad de las reacciones: en los extractos de hoja y tallo fue semejante y más intensa que en el extracto de flor.

Con respecto a la detección de flavonoides (reacción de Shinoda), los extractos de hoja y tallo presentaron una intensidad de reacción similar, mientras que el extracto de flor dio un resultado negativo.

En la detección de estos dos grupos, los extractos de hoja y tallo tuvieron intensidades de reacción similares, sin embargo, presentaron diferencias en los rendimientos, ya que el extracto de hoja tuvo mayor rendimiento que el de tallo, y de los tres extractos, el de flor fue el de mayor rendimiento.

Extractos de acetato de etilo

Las pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios, mostraron la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides en los tres órganos, sin embargo, en el extracto de hoja se observó una mayor intensidad de reacción de ambos grupos de metabolitos.

En la prueba de detección de terpenos-esteroides, se observaron distintas intensidades de reacción, siendo mayor en hoja, después en tallo y por último en flor. En cuanto a la presencia de flavonoides, los extractos de flor y tallo tienen una intensidad similar, mientras que en el extracto de hoja es un poco más intensa.

Extractos metanólicos

En los tres extractos se detectó la presencia de alcaloides, flavonoides y glicósidos. Aunque se detectó la presencia de alcaloides en los tres extractos, la intensidad de la reacción fue baja, indicando poca cantidad de estos metabolitos.

En cuanto a la presencia de flavonoides hubo una diferencia de intensidad, siendo mayor en el extracto de hoja, enseguida en el extracto de flor y ligeramente positiva en el extracto de tallo.

La presencia de glicósidos fue mayor en el extracto de tallo y similar en los de hoja y flor.

Extractos acuosos

Se detectó la presencia de alcaloides, flavonoides y glicósidos en ambos extractos. En el extracto de hoja se observó una intensidad de reacción más fuerte en cuanto a la presencia de alcaloides, mientras que en las pruebas de detección de flavonoides y glicósidos, las intensidades de reacción fueron similares en los dos extractos.

Los extractos hexánicos y de acetato de etilo fueron positivos a la presencia de terpenos y esteroides, siendo los de acetato de etilo los que tuvieron mayor intensidad de reacción. Por otra parte, se detectaron alcaloides y glicósidos en los extractos metanólicos y acuosos. Esto se relaciona con la naturaleza del grupo de metabolitos secundarios en cuestión: los compuestos de baja o mediana polaridad como terpenos y esteroides, generalmente se encuentran en extractos hexánicos y de acetato de etilo, mientras que flavonoides, alcaloides y glicósidos se detectan en extractos polares como los metanólicos y acuosos. En ocasiones se pueden encontrar flavonoides en extractos de baja o mediana polaridad, lo cual depende de la cantidad y de la posición de los grupos hidroxilo u otros grupos químicos que se unan a estos compuestos (Havsteen, 2002).

En el caso de esta especie, se detectaron flavonoides en todos los extractos. Estos compuestos son muy importantes para la supervivencia de las plantas hemiparásitas, ya que, al establecerse en las copas de los árboles, estas plantas se encuentran más expuestas a la radiación solar, por lo que necesitan compuestos que las protejan de este tipo de radiación, función que desempeñan algunos flavonoides en las plantas.

En cuanto a los terpenos-esteroides, estos podrían impedir el ataque de agentes patógenos como hongos o bacterias, o el consumo por parte de algunos insectos, por lo que su presencia en estas plantas también es importante. Este tipo de compuestos le pueden dar ventaja a la

hemiparásita con respecto al hospedero, ya que no presenta los daños causados por microorganismos o insectos que suelen observarse en árboles invadidos por “muérdago”.

Los alcaloides, por otro lado, también desempeñan un papel importante en la defensa contra ataque de otros organismos, sin embargo, no todas las Lorantáceas tienen este tipo de compuestos, por lo que algunos podrían ser transportados del hospedero, tal como se ha observado en la hemiparásita *Benthamina alyxifolius*, de la cual se pueden extraer alcaloides en baja concentración cuando parasita *Duboisia myoporoides*, especie cuyos alcaloides tienen aplicaciones médicas (Calder & Bernhardt, 1983).

7.2.2. Cromatografía en capa fina

Los perfiles de los extractos hexánicos fueron revelados con reactivo Liebermann-Burchard).

En el sistema de elución hexano: acetato de etilo 6.5:3.5, se observó que los perfiles cromatográficos fueron similares, se identificaron 13 bandas en los tres extractos, de las cuales 11 tuvieron los mismos valores de R_f (factor de retención por sus siglas en inglés), (**Figura 7**).

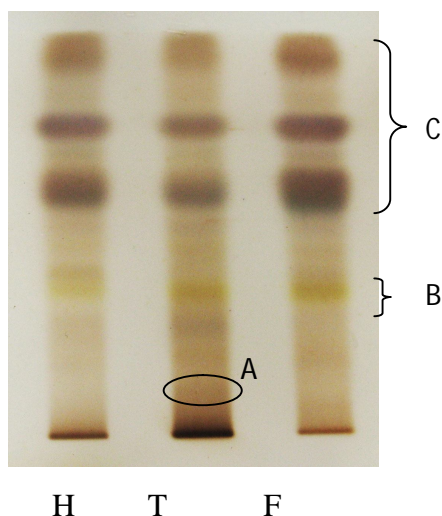


Figura 7. Placa de las muestras de los extractos hexánicos de hoja (H), tallo (T) y flor (F) de *C. loniceroides*. El sistema de elución utilizado fue hexano: acetato de etilo 6.5:3.5. La placa está revelada con reactivo de Liebermann-Burchard.

La placa fue revelada con reactivo de Liebermann-Burchard, revelador específico para terpenos-esteroides. Se observaron las mismas coloraciones en los diferentes compuestos con el mismo Rf de cada extracto, aunque la intensidad de dichos compuestos fue diferente en cada órgano. Estas diferencias pueden atribuirse a las funciones de cada órgano.

En el extracto de tallo, se encontró una mayor concentración de compuestos con respecto a los otros órganos principalmente en la parte más polar de la placa y en el punto de aplicación, lo cual se relaciona con el hecho de que en el tallo se transportan diversos componentes desde el haustorio al resto de la planta y viceversa. Se encontró además, una banda que no se observó en hoja y flor en la zona más polar de la placa (**Figura 7, letra A**).

La banda amarilla que se observó en los tres extractos, en la parte de mediana polaridad (**Figura 7, letra B**), fue más intensa en los extractos de tallo y flor, mientras que las bandas rosas y moradas situadas en la parte menos polar, fueron más intensas en el extracto de flor, después en el de hoja y por último en el de tallo (**Figura 7, letra C**).

Extractos de acetato de etilo

Se prepararon dos placas con los tres extractos de acetato de etilo, una se eluyó con hexano-acetato de etilo 6:4 y la otra con acetato de etilo-metanol 9:1, ya que en la primera, a pesar de que se observaron distintas bandas, en el punto de aplicación quedó una gran cantidad de muestra, la cual fue posible desarrollar con ayuda de una fase móvil más polar. En la **Figura 8** se muestra la placa eluida con la fase menos polar.

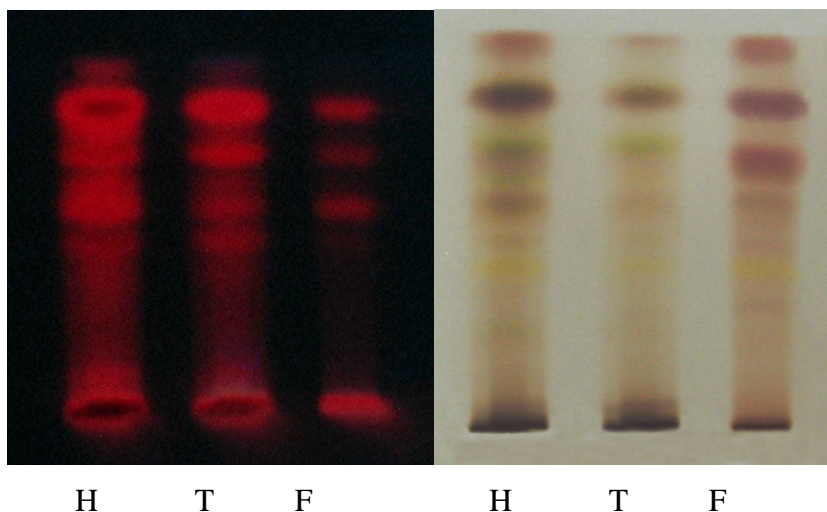


Figura 8. Placa de las muestras de los extractos de acetato de etilo de hoja (H), tallo (T) y flor (F). Del lado izquierdo se observa la placa bajo luz UV de longitud larga ($\lambda=365$ nm) sin revelar y del lado derecho se muestra la misma placa pero revelada con reactivo de Liebermann-Burchard. El sistema de elución utilizado fue hexano: acetato de etilo 6:4.

En este perfil, los extractos de hoja y tallo mostraron similitud, mientras que el extracto de flor mostró diferencias. En la placa observada bajo luz UV de 365 nm, se observaron manchas similares en los extractos de hoja y tallo, siendo en hoja en donde se observaron más intensas. En cuanto al extracto de flor, la cantidad de compuestos que se observaron en luz UV es menor con respecto a tallo y hoja (**Figura 8, izquierda**).

Al revelar la placa, se observó un mayor número de bandas en los extractos de flor, y, aunque algunas tuvieron un Rf similar al de las bandas de los otros extractos, la coloración que

presentaron fue diferente (**Figura 8, derecha**). Las bandas de los extractos de hoja y tallo fueron similares, sin embargo, este último presentó una menor intensidad en todos sus componentes.

En la placa eluida con acetato de etilo-metanol 9:1, bajo luz UV de 365 nm, se observaron similitudes entre los extractos de hoja y tallo. En el extracto de flor sólo se observaron tres bandas en la zona de menor polaridad de la placa (**Figura 9, izquierda**).

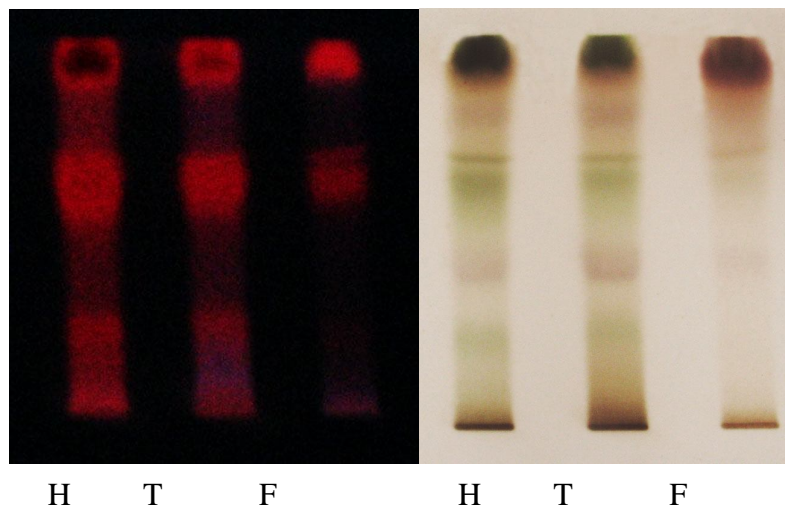


Figura 9. Placa de las muestras de los extractos de acetato de etilo de hoja (H), tallo (T) y flor (F). Del lado izquierdo se observa la placa bajo luz UV de longitud larga ($\lambda=365$ nm), sin revelar y del lado derecho se muestra la misma placa pero revelada con reactivo de Liebermann-Burchard. El sistema de elusión utilizado fue acetato de etilo: metanol 9:1

Al revelar la placa, se observó que los compuestos presentes en los tres órganos son semejantes, modificando notablemente su concentración, siendo el extracto de tallo el que presentó mayor concentración, enseguida el de hoja y por último el de flor (**Figura 9, derecha**).

Aunque se observaron diferencias entre los órganos en los dos perfiles obtenidos al ser observados bajo luz UV, revelados mostraron el mismo número de componentes con intensidades diferentes para cada banda.

Extractos polares: metanólicos y acuosos

En la placa eluida con butanol-ácido acético-agua 4.5:0.75:0.75 se observó, bajo luz UV, una gran similitud entre los tres extractos metanólicos (**Figura 10, izquierda**). Cabe hacer notar que de estos, el extracto de hoja presentó dos componentes en mayor concentración que en los extractos de tallo y flor (**Figura 10, letras A y B**).

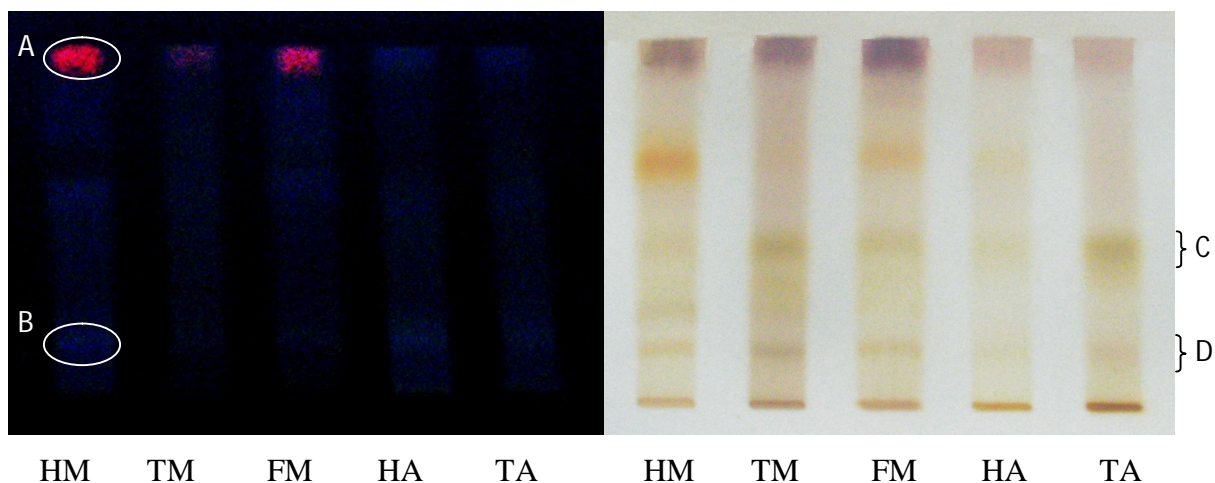


Figura 10. Placa de las muestras de los extractos metanólicos de hoja (HM), tallo (TM) y flor (FM) y acuosos de hoja (HA) y tallo (TA). Letras C y D = bandas que se presentaron en todos los extractos. Del lado izquierdo se observa la placa bajo luz UV de longitud larga ($\lambda=365$ nm) y del lado derecho la misma placa revelada con reactivo de Liebermann-Burchard. El sistema de elución utilizado fue butanol-ácido acético-agua 4.5:0.75:0.75.

Por otro lado, se observó una diferencia importante entre los extractos metanólicos con respecto a los acuosos, en estos últimos se observó una menor cantidad de compuestos.

Las distintas bandas se observaron mejor al revelar la placa; los perfiles de los extractos metanólicos de hoja y flor fueron muy parecidos: las bandas observadas en el extracto metanólico de flor, se encontraron en el extracto metanólico de hoja presentando las mismas coloraciones (anaranjado, café y verde olivo). El extracto metanólico de tallo compartió 4 bandas con el extracto de flor y 5 con el metanólico de hoja. Tanto los extractos metanólicos como los acuosos

compartieron dos bandas, las cuales se detectaron con intensidades diferentes, estando más concentradas en los dos extractos de tallo (**Figura 10, letras D y C**).

La otra placa se eluyó con fase móvil acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético- agua 100:11:11:27 y se utilizó revelador de Productos Naturales para determinar la presencia de flavonoides. La placa se observó en el gabinete de luz UV con longitud de 365 nm y se observó con claridad la coloración de los flavonoides presentes en los extractos (**Figura 11, letra A**). Este tipo de compuestos, al ser expuestos a una longitud de onda de aproximadamente 366 nm, dependiendo de su estructura específica, van a mostrar una coloración amarilla, verde o azul (Medic-Saric *et al.*, 2008), en este caso se observaron bandas de color amarillo.

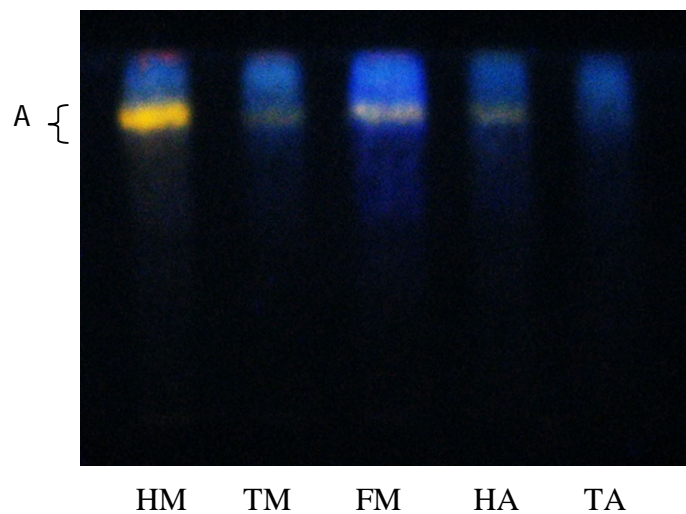


Figura 11. Placa de las muestras de los extractos metanólicos de hoja (HM), tallo (TM) y flor (FM) y acuosos de hoja (HA) y tallo (TA) revelada con RPN (revelador de productos naturales) y vista bajo luz UV de longitud larga ($\lambda=365$ nm). Se utilizó el sistema de elución acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua 100:11:11:27.

De acuerdo a la coloración esperada para la detección de flavonoides, se detectó la presencia de estos compuestos en 4 de los 5 extractos cromatografiados, en el extracto acuoso de tallo no se detectaron. Por otro lado, en el extracto metanólico de hoja se observó la mayor intensidad de este compuesto. Un comportamiento similar fue observado en las pruebas coloridas, en las que el extracto metanólico de hoja fue el que tuvo mayor intensidad de reacción en la detección de flavonoides, y los de menor intensidad fueron los acuosos.

El análisis fitoquímico mostró las diferencias y semejanzas que existen entre tallo, hoja y flor con respecto a los metabolitos secundarios. El análisis de grupos de metabolitos secundarios mostró la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides como principales compuestos presentes en la planta. Se observó que, aunque se encontraron en todos los órganos analizados, se observaron intensidades distintas, siendo el tallo el órgano con mayor abundancia de estos compuestos.

También se observó que los extractos con mayores rendimientos que fueron los acuosos y los metanólicos, en el perfil cromatográfico mostraron un bajo número de componentes, mientras que los de rendimientos más bajos (los de acetato de etilo), fueron los que presentaron un mayor de compuestos. Esto implica una mayor variedad de los compuestos de poca y mediana polaridad que se encuentran en menor cantidad, mientras que los compuestos polares son menos variados pero se pueden encontrar en mayor cantidad.

7.3. Pruebas biológicas

7.3.1. Actividad citotóxica

Los extractos de *C. loniceroides* presentaron actividad diferente en los dos ensayos probados: en *A. salina* los extractos no presentaron actividad, en contraste, la actividad citotóxica para algunas líneas celulares fue importante; a continuación se describen los resultados de cada ensayo.

Ensayo con *Artemia salina*

En el **Cuadro 2**, se muestran los porcentajes de mortalidad de los nauplios de *A. salina* expuestos a los extractos de *C. loniceroides*. El porcentaje de mortalidad de cada tratamiento se obtuvo mediante la siguiente fórmula, utilizada por Meyer *et al.*(1982):

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{Número de individuos del control} - \text{Número de individuos del tratamiento}}{\text{Número de individuos del control}} \times 100$$

Cuadro 2. Porcentaje promedio de mortalidad de los nauplios expuestos a los extractos de hoja, tallo y flor de *C. loniceroides*.

Extracto	Concentración		
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
Hexánico de hoja	0	4.17	2.08
Hexánico de tallo	2.04	0	0
Hexánico de flor	0	0	8.16
Acetato de etilo de hoja	4	2	14
Acetato de etilo de tallo	0	2	4
Acetato de etilo de flor	6.38	6.38	4.26
Metanólico de hoja	6	4	52
Metanólico de tallo	8.89	8.89	15.56
Metanólico de flor	2.04	4.08	24.49
Acuoso de hoja	8.16	4.08	6.12
Acuoso de tallo	0	4.08	6.12

Solamente el extracto metanólico de hoja tuvo actividad frente a *A. salina*, causando una mortalidad del 52% a una concentración de 1000 ppm. Los otros extractos no tuvieron actividad, ya que mostraron porcentajes de mortalidad muy bajos, sin embargo, se observó una tendencia de los extractos metanólicos a tener mayor actividad a una concentración de 1000 ppm, causando el de tallo, una mortalidad del 15.56 % y el de flor de 24.49 %.

En el extracto metanólico de hojase observó poco más del 50% de mortalidad de los nauplios, indicando que el valor LC_{50} se encuentra alrededor de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (**Cuadro 2**), se observó un cambio abrupto en el efecto citotóxico al cambiar de una concentración de 100 ppm, en donde la mortalidad es de 4%.

Analizando los perfiles cromatográficos del extracto activo, se observó una mayor concentración de algunos componentes, los cuales podrían ser responsables de esta actividad citotóxica.

Este ensayo es útil para la pre-evaluación de extractos vegetales en el descubrimiento de compuestos con actividades plaguicidas y farmacológicas (Pino & Jorge, 2010), principalmente antitumoral y citotóxica, ya que se ha determinado la existencia de una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* spp. y la toxicidad frente a diversas líneas celulares cancerosas (Meyer *et al.*, 1982). Sin embargo, se trata de un bioensayo general y la sensibilidad de este organismo puede variar con respecto a la actividad biológica de interés, por lo que no se descarta que los extractos que no tuvieron actividad frente a *A. salina*, puedan tener actividad en otros modelos.

El ensayo con esta especie es un ensayo general de toxicidad, y, aunque por lo regular exista una correlación entre la actividad de un producto natural frente a este crustáceo y su actividad antitumoral, también es posible que haya diferencias, ya que, como algunos autores han sugerido, la ausencia en *A. salina* de estructuras desarrolladas como receptores, insinúa la posibilidad de obtener falsos resultados negativos (Pino & Jorge, 2010; Serrano *et al.*, 1996).

Ensayo con líneas celulares cancerosas humanas

Los resultados de la actividad citotóxica de los extractos en las diferentes líneas celulares se observan en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de crecimiento de líneas celulares cancerosas.

Extracto	Líneas celulares cancerosas					
	Glía de SNC (U-251)	Próstata (PC-3)	Leucemia (K-562CML)	Colon (HCT-15)	Mama (NCF-7)	Pulmón (SKLU-1)
Hexánico de hoja	69.3	40.7	100	28.2	30.5	22.2
Hexánico de tallo	50.8	28.6	77.3	31	38	29.7
Hexánico de flor	SA	4	33.1	13.5	19.4	8.3
Acetato de etilo de hoja	14	6	51.1	30.7	35	22.7
Acetato de etilo de tallo	21.9	SA	59.2	23.4	24.2	8.3
Acetato de etilo de flor	100	100	100	69.2	86.1	100
Metanólico de hoja	16	SA	43.9	12.5	15.5	8.5
Metanólico de tallo	27.5	SA	72.7	SA	14.4	11.9
Metanólico de flor	21.7	SA	42.4	16.1	4.4	4
Acuoso de hoja	4.6	SA	11	9.9	SA	SA
Acuoso de tallo	12.9	4.1	34.5	13.1	3	36.9

SA= sin actividad citotóxica

En contraste a lo observado en el ensayo con *A. salina*, distintos extractos tuvieron actividad citotóxica frente a las líneas celulares probadas.

El extracto de acetato de etilo de flor tuvo efecto citotóxico frente a las 6 líneas probadas (**Cuadro 3**), causando una mortalidad del 100% en 4 de ellas: glía de sistema nervioso central, próstata, leucemia y pulmón. En las otras dos líneas, causó una mortalidad de más de la mitad: 69% en células de colon y 86% en células de mama.

Otros extractos activos frente a uno o dos de estos tipos celulares fueron: el hexánico de hoja, causando una mortalidad del 100% de las células leucémicas y del 69% en glía de SNC; el hexánico de tallo, con un 50% de mortalidad en glía de SNC y un 77% en células leucémicas; el de acetato de etilo de hoja con una mortalidad de 51% en células leucémicas, el de acetato de etilo de tallo, con un 59% de mortalidad también en células leucémicas y finalmente el metanólico de tallo, con un 73% de mortalidad en células leucémicas.

Se observó que las células leucémicas fueron sensibles a 6 extractos de *C. loniceroides*, de los cuales, tres son de tallo y tuvieron actividad citotóxica principalmente en este tipo de células. Esto puede ser de importancia para el tratamiento de leucemia, ya que se observó una especificidad en la toxicidad de estos extractos frente a las células cancerosas.

Los extractos que causaron una mortalidad del 100% de la población celular, fueron el extracto hexánico de hoja y el extracto de acetato de etilo de flor. El extracto hexánico de hoja, al igual que el de tallo, no sólo tuvieron una actividad importante contra éstas células, sino también contra células cancerosas de glía de SNC.

Cabe resaltar que los extractos con mayor actividad en esta prueba fueron los hexánicos y los de acetato de etilo de todos los órganos, lo que sugiere que la actividad citotóxica en estas líneas celulares puede deberse a uno o más compuestos no polares. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado por Waizel *et al.* (1994) acerca de la actividad citotóxica de *C. grahami*, especie cuyos extractos hexánicos de diferentes órganos (tallo, inflorescencia y hoja) tuvieron actividad frente a distintas líneas celulares cancerosas, mientras que los extractos metanólicos no mostraron ninguna actividad.

Debido al antecedente de actividad citotóxica del extracto acuoso de fruto de *C. loniceroides* en células cancerosas de mama ZR-75 (Serrano, 2010), se esperaría una posible sensibilidad de la línea de células cancerosas de mama utilizadas en este ensayo

(NCF-7) frente a uno o varios extractos de la especie, sin embargo, la sensibilidad entre una línea y otra, aunque sean el mismo tipo celular, puede variar. También se esperaría que los extractos acuosos tuvieran actividad frente a una o más líneas celulares, pero en este caso, los extractos polares mostraron una actividad más reducida, a excepción del extracto metanólico de tallo.

Estas diferencias pueden deberse a que la composición química del fruto puede ser distinta a la de los otros órganos de la planta. Por otro lado, la variación de la composición química y, por lo tanto, la actividad biológica de una misma especie dependen de distintos factores, entre ellos el tipo de hospedero, las condiciones ambientales y las condiciones de recolecta (Ogoamaka, 2009).

El extracto de acetato de etilo de flor, a diferencia de los extractos de tallo y hoja, mostró una actividad importante en las 6 líneas celulares probadas, pudiendo ser este extracto el que contiene mayor cantidad de compuestos activos de amplio espectro. Según lo observado en las pruebas de metabolitos secundarios, en este extracto se detectaron terpenos-esteroides así como flavonoides; y de acuerdo con el perfil cromatográfico, se observaron diferencias en la coloración de las bandas con respecto a los otros órganos, siendo más intensas en el de flor, principalmente las de la zona de menor polaridad, por lo que la actividad de este extracto, puede deberse a estos compuestos de baja polaridad.

7.3.2. Actividad bactericida

Se observó actividad bactericida en algunos extractos y se determinó la mínima concentración inhibitoria (MCI) de los extractos activos (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. MCI (mg/disco) de los extractos de hoja, tallo y flor de *C. loniceroides*

Bacteria	MCI (mg/disco)										
	Hoja				Tallo				Flor		
	He	AcoEt	MeOH	H ₂ O	He	AcoEt	MeOH	H ₂ O	He	AcoEt	MeOH
Gram positivas											
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	4	4	-	-	1	2	-	-	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	4	-	-	1	2	-	-	4
Gram negativas											
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	4	-	-	1	2	-	-	4
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	4	-	-	-	2	2	-	-	4

MCI = Concentración mínima de inhibición (miligramos por disco)

He, AcoEt, MeOH y H₂O representan extracto hexánico, de acetato de etilo, metanólico y acuoso respectivamente.

- = Sin actividad

Los extractos de baja y de mediana polaridad no mostraron actividad. Los extractos con actividad en las cuatro bacterias fueron: el metanólico de tallo, el cual mostró la MCI más baja (1 mg/disco), el acuoso de tallo (2 mg/disco) y el metanólico de flor, presentando una MCI mayor (4 mg/disco).

El extracto acuoso de hoja no mostró actividad frente a *Salmonella typhi*, y el metanólico de este mismo órgano sólo tuvo actividad en dos bacterias: *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi*. Este extracto fue activo a una concentración de 4 mg/disco.

En el **Cuadro 5** se muestra el diámetro de los halos de inhibición.

Cuadro 5. Diámetro promedio de inhibición de crecimiento de los extractos con actividad bactericida de *C. loniceroides* en las distintas bacterias

Bacteria	Diámetro promedio de la zona de inhibición (mm)							
	Hoja		Tallo					Flor
	MeOH	H ₂ O	MeOH			H ₂ O		MeOH
	4 *	4*	1*	2*	4*	2*	4*	4*
Gram positivas								
<i>Bacillus subtilis</i>	8.33 ⁺⁺	8 ⁺	7 ⁺	9 ⁺	11⁺	8 ⁺	10.67⁺⁺	8.67 ⁺⁺
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	7.33 ⁺⁺	7 ⁺	7.33 ⁺⁺	9.33 ⁺⁺	8 ⁺	10⁺	9.67 ⁺⁺
Gram negativas								
<i>Escherichia coli</i>	-	8 ⁺	7.67 ⁺⁺	9.67 ⁺⁺	11.33⁺⁺	8.67 ⁺⁺	10.67⁺⁺	9.33 ⁺⁺
<i>Salmonella typhi</i>	12⁺	-	-	8 ⁺	10⁺	8 ⁺	11⁺	8.3 ⁺⁺

*= Miligramos por disco

-= Sin actividad

⁺=Desviación estándar: ± 0

⁺⁺=Desviación estándar: ± 0.058

n = 3

Los halos más grandes se presentaron alrededor de los discos con extracto acuoso y metanólico de tallo a una concentración de 4 mg/disco, así como también en el tratamiento con extracto metanólico de hoja frente a *S. typhi*.

Los extractos de hoja fueron los de menor actividad bactericida, sin embargo, hay que recalcar que el extracto metanólico de hoja presentó mayor actividad frente a *S. typhi* que otros extractos, por lo cual este extracto puede tener actividad específica contra esta bacteria.

Según algunos estudios, la actividad antibacteriana de los “muérdagos” puede deberse a la presencia de terpenoides (Wahab *et al.*, 2010), pero en el caso de *C.*

loniceroides no se observó este tipo de actividad en los extractos con estos compuestos, que fueron los de baja y mediana polaridad.

La actividad de los extractos de esta especie es más parecida a la estudiada en otras investigaciones en las que se ha determinado que la actividad bactericida de ciertas Lorantáceas se debe en parte a compuestos fenólicos, principalmente flavonoides glicosilados, tales como rutina, los cuales se encontraron en extractos metanólicos y acuosos (Soberón *et al.*, 2007). Los extractos de *C. loniceroides* con actividad bactericida fueron los más polares, y según la pruebas de detección de metabolitos secundarios y sus perfiles cromatográficos, estos extractos presentan flavonoides, glucósidos y alcaloides, por lo que su actividad bactericida puede atribuirse a estos grupos de metabolitos secundarios.

Esta especie presentó igual actividad tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, por lo que la estructura de la pared de las bacterias no impide la entrada de los compuestos con actividad bactericida.

Es importante recalcar que el único extracto que tuvo actividad frente a *A. salina* (el metanólico de hoja), tuvo actividad bactericida, además, se observó que los otros dos extractos metanólicos, los cuales tuvieron una importante actividad bactericida, mostraron una tendencia a tener mayor actividad frente a este crustáceo. Esto sugiere, que, aunque no existió una correlación entre el ensayo de *A. salina* y las líneas celulares cancerosas, sí se observó una tendencia con respecto a la actividad antibacteriana, de este manera se puede inferir que los grupos de metabolitos secundarios de *C. loniceroides* que causan la mortalidad de parte de la población de *A. salina*, pueden ser los mismos que ocasionaron la actividad bactericida, siendo más eficientes en estos organismos unicelulares.

7.3.3. Actividad antialimentaria

El área foliar no consumida por las larvas de *S. frugiperda* fue medida con un escáner Área Meter AM300 ADC Bioscientific LtD. Con estos datos se calculó el área foliar consumida y el porcentaje promedio de consumo (**Cuadros 6, 7 y 8**) los cuales se graficaron y se muestran en las **Figuras 12, 13 y 14**.

Cuadro 6. Datos obtenidos del consumo de discos foliares tratados con extractos hexánicos de hoja y tallo de *C. loniceroides* frente a *S. frugiperda*. La media indica el área promedio no consumida, con la cual se hicieron los cálculos necesarios para obtener el porcentaje promedio de consumo.

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar	Área consumida promedio (mm ²)	Porcentaje promedio de consumo (%)
Extracto de hoja					
control	164.1	99.80	22.316	150.04	47.76
10 ppm	30.75	73.20	16.367	283.41	90.21
100 ppm	88.1	67.38	15.066	226.06	71.96
1000 ppm	189.5	101.14	22.616	124.66	39.68
Extracto de tallo					
control	169.65	55.69	12.45	144.51	46.00
10 ppm	168.4	50.16	11.22	145.76	46.40
100 ppm	128.35	43.53	9.73	185.81	59.14
1000 ppm	143.95	35.00	7.83	170.71	54.34

En los extractos hexánicos de tallo, no se observaron diferencias de consumo respecto al control, es decir, los consumos observados en los diferentes tratamientos no disminuyeron con respecto al control. En los extractos de hoja se observó un ligero aumento en el consumo del tratamiento a la concentración de 10 ppm, sin embargo, no es significativo con respecto al control (**Figura 12**).

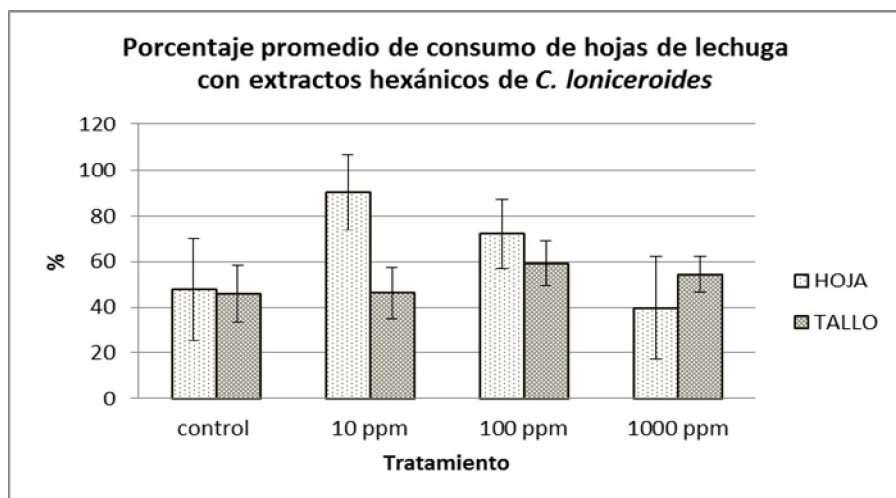


Figura 12. Porcentaje promedio de consumo de discos foliares con extractos hexánicos de hoja y tallo de *C. loniceroides*

Por otro lado, en los tratamientos con el extracto de acetato de etilo de hoja (Cuadro 7 y Figura 13), el consumo de los discos foliares fue más bajo de acuerdo al aumento en la concentración, sin embargo, sólo hubo diferencia entre la concentración de 1000 ppm del extracto de tallo y el control.

Cuadro 7. Datos obtenidos del consumo de discos foliares tratados con extractos de acetato de etilo de hoja y tallo de *C. loniceroides* frente a *S. frugiperda*. La media indica el área promedio no consumida, con la cual se hicieron los cálculos necesarios para obtener el porcentaje promedio de consumo.

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar	Área consumida promedio	Porcentaje promedio de consumo
Extracto de hoja					
control	76	111.63	25.609	238.16	75.81
10 ppm	127.9	103.90	23.835	186.26	59.29
100 ppm	157.55	119.06	27.315	156.61	49.85
1000 ppm	155.95	97.08	22.272	158.21	50.36
Extracto de tallo					
control	157.25	59.69	13.35	156.91	49.95
acetato 10	146.1	45.21	10.11	168.06	53.49
acetato 100	165.1	36.99	8.27	149.06	47.45
acetato 1000	228.05	53.95	12.06	86.11	27.41

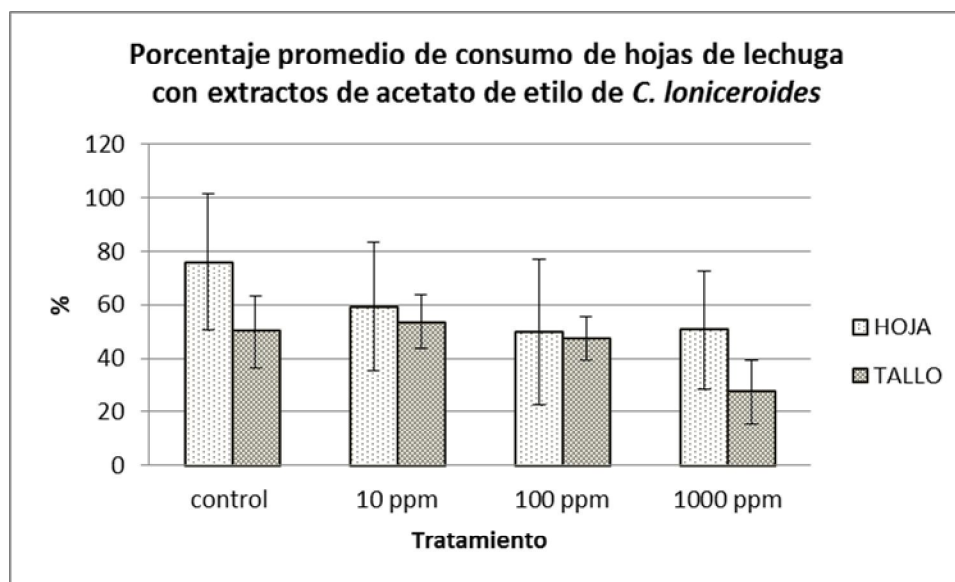


Figura 13. Porcentaje promedio de consumo de discos foliares tratados con extractos de acetato de etilo de hoja y tallo de *C. loniceroides*

En el extracto de acetato de etilo de tallo, se detectó la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides y de acuerdo al perfil de la **Figura 9**, se observó mayor concentración de estos metabolitos en este extracto, por lo que estos compuestos podrían ser responsables de la disminución del consumo por parte de las larvas.

Los tratamientos con el extracto metanólico de hoja (**Cuadro 8 y Figura 14**), no fueron distintos con respecto al control, ya que las larvas consumieron un porcentaje similar en todos los tratamientos. Sin embargo, se observaron tendencias de disminución del consumo por parte de las larvas en los tratamientos de tallo a 10 y 100 ppm; las desviaciones estándar son grandes, por lo que se sugiere que para completar este estudio, se realicen ensayos con poblaciones más grandes y también con concentraciones más altas, además de considerar que la presencia de glucósidos pueden estar estimulando la alimentación y por lo tanto estudios detallados pueden dar información de un efecto a mayor tiempo de contacto con los extractos.

Cuadro 8. Datos obtenidos del consumo de discos foliares tratados con extractos metanólicos de hoja y tallo de *C. loniceroides* frente a *S. frugiperda*. La media indica el área promedio no consumida.

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar	Área consumida promedio	Porcentaje promedio de consumo
Extracto de hoja					
control	138.4	97.42	22.349	175.76	55.95
10 ppm	85.3	101.63	23.316	228.86	72.85
100 ppm	80.2	67.85	15.566	233.96	74.47
1000 ppm	117.35	92.99	21.333	196.81	62.65
Extracto de tallo					
control	180.4	90.42	20.74	133.76	42.58
acetato 10	201.1	81.28	18.65	113.06	35.99
acetato 100	200.3	96.23	22.08	113.86	36.24
acetato 1000	125.55	71.13	16.32	188.61	60.04

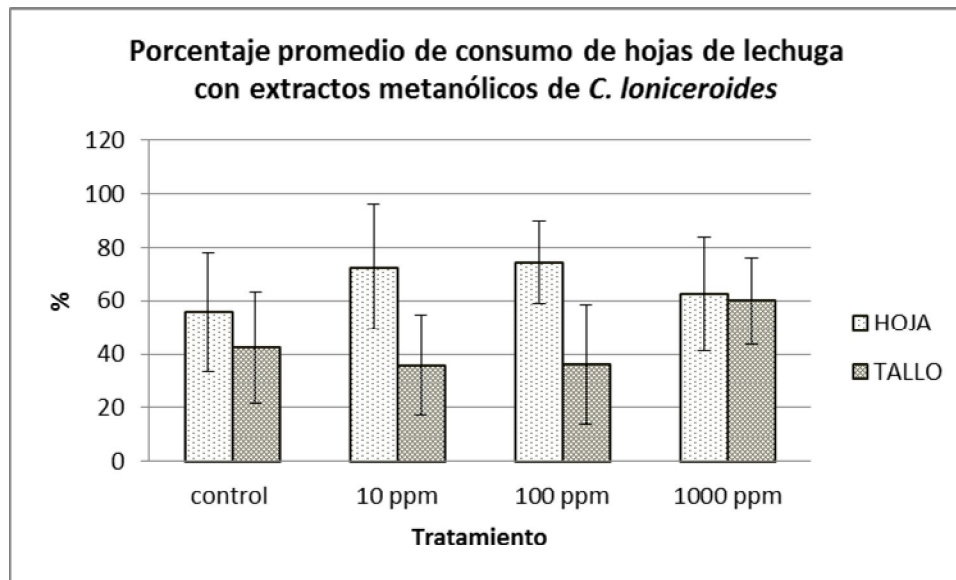


Figura 14. Porcentaje promedio de consumo de discos foliares tratados con extractos metanólicos de hoja y tallo de *C. loniceroides*.

Habría que tomar en cuenta que de acuerdo al tamaño de la desviación estándar, sería deseable repetir el experimento con concentraciones mayores a 1000 ppm y con una

población más grande y homogénea, así como también, se podría realizar una separación cromatográfica para probar la actividad antialimentaria de las fracciones obtenidas, suponiendo un posible antagonismo de los compuestos de los extractos.

En general, los extractos no mostraron ni efecto insecticida ni efecto antialimentario, solamente el extracto de acetato de etilo de tallo a una concentración de 1000 ppm. Tendría que hacerse un ensayo a largo plazo para verificar si las larvas sufren alteraciones en el desarrollo por causa de algunos compuestos presentes en los extractos.

No se realizaron ensayos con los extractos de flor, ya que se ha reportado que insectos de distintos órdenes, entre ellos lepidópteros, polinizan diversas especies de “muérdagos”, sobre todo aquellas cuyas flores son poco llamativas (Watson, 2001). Por esta razón no se esperaría que los extractos de flor tuvieran actividad antialimentaria, sino al contrario, serían compuestos que atraen a los insectos, por lo que el efecto sería opuesto al que se busca.

8. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico mostró la presencia diferencial de grupos de metabolitos secundarios en los distintos órganos estudiados:

- El tallo presentó terpenos-esteroides, flavonoides y alcaloides y de estos grupos el que presentó mayor intensidad de reacción fue el de los terpenos-esteroides, seguido de los flavonoides y el grupo con menor intensidad fueron los alcaloides.
- La hoja presentó el mismo patrón que el tallo, aunque las reacciones fueron ligeramente más intensas para terpenos. Para flavonoides también se observó el mismo patrón, sin embargo, en comparación con tallo, se registró una mayor intensidad de este grupo de metabolitos secundarios en el extracto metanólico. La reacción para determinar alcaloides también fue ligeramente más intensa que para el tallo.
- En la flor, aunque se observaron los mismos grupos de metabolitos secundarios, se registraron menores intensidades que en tallo y hoja.

La hoja mostró mayor intensidad de los grupos de metabolitos secundarios analizados. Los perfiles cromatográficos corroboran esta información mostrando una diferencia de intensidades en las bandas de los extractos de los distintos órganos.

De acuerdo con la información obtenida en el análisis fitoquímico, en relación con la actividad biológica, se concluye que:

- De los cuatro ensayos realizados, la actividad biológica más importante fue la de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas, seguida de la actividad bactericida. Los otros dos ensayos no mostraron resultados positivos. Esto se relaciona con estudios de otras especies del mismo género.
- Los extractos más activos fueron el de acetato de etilo de flor y los hexánicos de hoja y tallo. Los grupos presentes en estos extractos fueron

terpenos-esteroides y flavonoides, y cabe resaltar que el extracto de acetato de etilo de flor mostró una actividad importante en las seis líneas probadas, mientras que los otros dos extractos mostraron actividad importante sólo en dos líneas: Leucemia (K-562CML) y Glía de SNC (U-251).

- La actividad bactericida se detectó en los extractos polares de los tres órganos, los cuales presentaron principalmente flavonoides y, en menor intensidad alcaloides.

Los grupos de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica encontrada son diferentes:

- La actividad citotóxica de los extractos de *C. loniceroides* que mostraron actividad se correlaciona principalmente a la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides.
- Por otro lado, la actividad bactericida de *C. loniceroides* se relaciona a los extractos polares en donde se encontraron compuestos tales como flavonoides, alcaloides y glicósidos.

9. RECOMENDACIONES

Para profundizar en el estudio de la actividad biológica encontrada en el presente trabajo, se recomienda realizar una separación cromatográfica de los extractos con la mayor actividad registrada y analizar las fracciones obtenidas hasta llegar a la purificación de compuestos.

Otro aspecto importante a analizar es si la composición química y la actividad de la especie es afectada por el hospedero en el que se desarrolla, para lo cual se tendrían que recolectar ejemplares de distintas especies de árboles y hacer una comparación de la actividad biológica y de la composición química de la especie.

10. REFERENCIAS

Alvarado Rosales, D. y L. de L. Saavedra Romero. 2005. El género *Cladocolea* (Loranthaceae) en México: Muérdago verdadero o injerto. **Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente** 11(1): 5-9.

Alvarado Rosales, D., L. de L. Saavedra Romero y E. Cárdenas Soriano. 2009. Anatomía de la interacción *Cladocolea loniceroides* (Van Tieghem) Kuijt- *Salix bonplandiana* Kunth. **Nota Técnica, Ciencia Forestal en México** 34 (106): 191-203.

Bauer, A., W. Kirby, J. Sherris y M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology** 45 (4): 493-496.

Büssing, A. 2000. **Mistletoe, the genus *Viscum***. Harwood academic publishers. Amsterdam, The Netherlands. 280 p.

Calder, M. and P. Bernhardt. 1983. **The biology of mistletoes**. Academic Press. Sydney, Australia. 384 p.

Calderón, G., y J. Rzedowski. 2001. **Flora fanerogámica del Valle de México**. Instituto de Ecología, Centro Regional de Ecología: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. pp. 98-102.

Cerdá Zolezzi, P., T. Fernández, P. Aulicino, V. Cavaliere, S. Greczanik, E. Caldas Lopes, M. Wagner, R. Ricco, A. Gurni, S. Hajos, and E. Alvarez, 2005. *Ligaria cuneifolia* flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells. **Immunobiology** 209 (10): 737-749.

Cházaro Basáñez, M. de J., H. Oliva Rivera, F. Ramón Farías, y J. A. Vázquez García. 2005. *Cladocolea oligantha* (Loranthaceae) un nuevo registro para Veracruz, México, y datos generales sobre este taxón. **Polibotánica** (20): 1-15.

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

Costa, R. M., A. F. Vaz, M. L. Oliva, L. C. Coelho, M. T. Correia and M. G. Carneiro-da-Cunha. 2010. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry** 45 (4): 526-533.

Cronquist, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. Nueva York. pp. 689-693.

Domínguez, X. A. 1973. **Métodos de investigación fitoquímica**. Ed. Limusa. México, D. F. 281 p.

Fernández, T., M. L. Wagner, B. G. Varela, R. A. Ricco, S. E. Hajos, A. A. Gurni and E. Alvarez. 1998. Study of an Argentine Mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae). **Journal of ethnopharmacology** 62 (1): 25-34.

Fusco, M. del R., E. Petenatti, N. Inostroza, A. San Martín, y P. Rivera. 2004. Principios activos de la *Ligaria cuneifolia*, una planta medicinal. **Ciencia y trabajo**. 6 (12): 79-82.

Geils, B. W. and I. Vázquez. 2002. Loranthaceae and Viscaceae in North America. *In*: Geils, B. W., J. Cibrián and B. Moody (Tech. Coords.). **Mistletoes of North American Conifers**. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Golden, CO. USA. pp. 1-8.

Guimarães, A. C., R. M. Kuster, A. C. Amaral, J. L. Pinto Ferreira, and A. C. Siani, 2007. Histological study of the leaf and stem of the amazonian medicinal mistletoe

Cladocolea micrantha (Loranthaceae). **International Journal of Botany** 3 (2): 218-221.

Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** 96 (2-3): 67-202.

Hawksworth, F. 1996. **Dwarf mistletoes: biology, pathology and systematics**. Agricultural handbook. Dept. of Agriculture, Forest Service. Washington D.C. 410 p.

Hernández Sánchez, A. P. (2009). **Plantas medicinales y su efecto antimicrobiano: un servicio ecosistémico de la cuenca del río Magdalena, D.F.** Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México, D.F. 89 p.

Karban, R. 1997. **Induced responses to herbivory**. University of Chicago Press. Chicago. 319 p.

Kuijt, J. 1969. **The Biology of Parasitic Flowering Plants**. University of California Press. Berkeley 246 p.

Kuijt, J. 1975. The genus *Cladocolea* (Loranthaceae). **Journal of the Arnold Arboretum** 56 (3): 265-335.

Martínez, M. 1993. **Las plantas medicinales de México**. 6a. ed. Ediciones Botas. México, D. F.

Medi-Saric, M., I. Jasprica, A. Mornar, Z. Males, 2008. Application of TLC in the isolation and analysis of flavonoids. *In*: Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma and T. Kowalska. **Thin Layer Chromatography in phytochemistry**. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton, USA pp. 405-423.

Meyer, B., N. Ferrigni, J. Pulnam, L. Jacobsen, D. Nichols and J. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica** 45 (5): 31-34.

Ogoamaka Osadebe, P., and E. Ogechukwu Omeje. 2009. Comparative acute toxicities and immunomodulatory potential of five Eastern Nigeria mistletoes. **Journal of Ethnopharmacology** 126 (2): 287-293.

Ohashi, K., H. Winarno, M. Mukai, M. Inoue, M. Sri Prana, P. Simanjuntak, and H. Shibuya. 2003. Indonesian Medicinal Plants. XXV. Cancer Cell Invasion Inhibitory Effects of Chemical Constituents in the Parasitic Plant *Scurrula atropurpurea* (Loranthaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 51 (3): 343-345.

Pattanayak, S., and P. Sunita. 2008. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology** 120 (2): 241-247.

Pérez Olvera, C., C. Ceja Romero y G. Vela Ramírez. 2006. Árboles y muérdagos: una relación que mata. **ContactoS** 59: 28-34.

Pino Pérez, O. y F. Jorge Lazo. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. **Rev. Protección Vegetal** 25(1): 34-43.

Press, M. and J. Graves. 1995. **Parasitic plants**. Chapman and Hall. London. 292 p.

Reid, N., J. Fittler and M. Allen. 2008. **Methods to manage mistletoe, a landholder's guide**. Southern New England Landcare Ltd. Armidale, Australia. 16 p.

Ríos, M. Y. and A. B. Aguilar-Guadarrama. 2004. Spectral assignments and reference data. **Magnetic Resonance in Chemistry** 42 (12): 1066-1068.

Serrano Maldonado, M. J. 2010. **Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de Xochimilco.** Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 82 p.

Shaw, D. C., D. M. Watson and R. L. Mathiasen. (2004). Comparison of dwarf mistletoes (*Arcetobium* spp., Viscaceae) in the western United States with mistletoes (*Amyema* spp., Loranthaceae) in Australia-ecological analogs and reciprocal models for ecosystem management. **Australian Journal of Botany** 52 (4): 481-498.

Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute** 82 (13): 1107-1112.

Soberón, J., M. Sgariglia, D. Sampietro, E. Quiroga, and M. Vattuone. 2006. *Tripodanthus acutifolius* and *Psittacanthus cuneifolius*: Loranthaceae. Sources of natural antimicrobials. **Molecular Medicinal Chemistry** 11: 24-25.

Stevens, P. (25 de Junio de 2011). **Angiosperm Phylogeny Website**. Recuperado el 15 de Agosto de 2011, de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>.

Vieira, O., M. Santos, G. Silva e A. Siqueira. 2005. Atividade antimicrobiana de *Struthantus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 149-154.

Wahab, O., A. Ayodele and J. Moody. (2010). TLC phytochemical screening in some Nigerian Loranthaceae. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy** 2 (5): 64-70.

Waizel Bucay, J. 2006. Las plantas en la historia de la medicina. *In*: Waizel Bucay, J. **Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria.** Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. pp. 181-200.

Waizel Bucay, J., J. Herrera Santoyo, D. Alonso Cortés y M. L. Villarreal Ortega. 1994. Estudios preliminares de la actividad citotóxica de muérdagos mexicanos: *Cladocolea grahami*, *Phoradendron reichenbachianum* y *Phoradendron galeottii* (Loranthaceae). **Revista del Instituto Nacional de Cancerología** 40 (3): 133-137.

Watson, D. M. (2001). Mistletoe- a keystone resource in forests and woodlands worldwide. **Annual Review of Ecology and Systematics** 32: 219-249.

Zee Cheng, R. (1997). Anticancer research on Loranthaceae plants. **Drugs of the future** 22 (5): 519-530.