



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

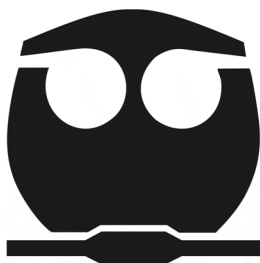
“Evaluación del potencial antioxidante de especies de muérdago. Cuantificación del contenido de catequinas”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CYNTHIA PAOLA ESPINOSA DEL ANGEL



México D. F.

2013



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.

Jurado Asignado

Presidente:	María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	Perla Deyanira Maldonado Jiménez
Secretario:	José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. suplente:	Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Cynthia Paola Espinosa del Angel

I. Lista de abreviaturas	iv
II. Lista de tablas, diagramas y figuras	v
III. Lista de figuras	v
Resumen	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Estrés Oxidante	3
2.1.2 Radicales libres, Prooxidantes y Especies Reactivas	3
2.1.2.1 Especies Reactivas del Oxígeno (ERO).....	5
2.1.2.2 Especies Reactivas del Nitrógeno.....	8
2.2. Antioxidantes	8
2.2.1 Clasificación de los antioxidantes	9
2.2.1.1 Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción	9
2.2.1.2 Clasificación según su origen.....	9
2.2.1.3 Clasificación de los antioxidantes por su fuente de obtención.....	12
2.2.2 Flavonoides	12
2.2.2.1 Catequinas	14
2.3 Muérdago	16
2.3.1 Generalidades de la familia Loranthaceae.....	16
2.3.2 Distribución geográfica	17
2.3.3 Importancia de su estudio.....	18
2.3.4 Compuestos reportados en especies de muérdago (Loranthaceae).....	18
2.3.5 <i>Struthanthus quercicola</i>	19
2.3.6 <i>Cladocolea loniceroides</i>	21
2.3.7 <i>Psittacanthus calyculatus</i>	22
2.4 Determinación del contenido de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu	25
2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante	25
2.5.1 Método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH*).....	25

2.5.2 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS ^{•+})	26
2.5.3 Ensayo del poder antioxidante/reductor del ión férrico (FRAP).....	27
2.5.4 Ensayo de blanqueamiento de β-caroteno	28
3. Justificación	29
4. Desarrollo Experimental	32
4.1. Análisis cromatográficos	32
4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	32
4.3 Material Vegetal.....	33
4.4 Obtención de los extractos.....	33
4.4.1 Proceso de extracción para las especies <i>Cladocolea loniceroides</i> y <i>Psittacanthus calyculatus</i>	33
4.4.2 Proceso de extracción para la especie <i>Struthanthus quercicola</i>	34
4.4.3 Fraccionamiento primario	34
4.4.4 Fraccionamiento secundario.....	34
4.4.5 Obtención de la (+)-catequina, a partir de la fracción F _{MII}	35
4.5 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	37
4.6 Evaluación de la actividad antioxidante.....	37
4.6.1 Método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH [•])	37
4.6.2 Ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS ^{•+}	38
4.6.3 Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).....	38
4.6.4 Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β caroteno	39
4.7 Identificación y cuantificación de (+)-catequina por cromatografía de alta eficiencia.....	39
4.7.1 Identificación de la presencia de (+)-catequina.....	39
4.7.2 Cuantificación de (+)-catequina	40

5. Resultados y Discusión	41
5.1 Aislamiento de la (+)-catequina a partir de las hojas del muérdago	41
5.2 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	43
5.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	44
5.3.1 Método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH').....	44
5.3.2 Ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS ⁺	46
5.3.3 Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).....	48
5.3.4 Ensayo de blanqueamiento de β caroteno	49
5.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.....	51
5.4.1 Identificación de la presencia de catequinas	51
5.4.2 Cuantificación de (+)-catequina en los extractos	56
6. Conclusiones	58
7. Perspectivas	59
8. Referencias	60

Lista de Abreviaturas

<i>I. Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
•OH	Radical hidroxilo
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
FRAP	Potencial reductor férrico
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
K₂S₂O₈	Persulfato de Potasio
LOO•	Radical peroxilo
L-OOH	Lipoperóxido
NO•	Óxido nítrico
O₂•⁻	Superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
RMN-13C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN-1H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
SEM	Desviación estándar media
SOD	Superóxido dismutasa
THBQ	Terbutil hidroquinona
TMS	Tetrametilsilano
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina

Lista de tablas, diagramas y figuras

II. Lista de tablas y diagramas

1	Principales moléculas involucradas en el estrés oxidativo
2	Clasificación de flavonoides
3	Estructura y actividad antioxidante de las principales catequinas.
4	Resumen de las fracciones obtenidas a partir de la fracción F _{P2A}
5	Resumen de las fracciones reunidas durante el fraccionamiento de F _{MII} .
6	Resultados del ensayo de cuantificación de fenoles totales
7	Resultados del ensayo de neutralización del radical DPPH [•]
8	Ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS ^{•+}
9	Resultados del ensayo de capacidad reductora del Fe ³⁺ (FRAP)
10	Resultados del ensayo de blanqueamiento de β caroteno
11	Resultado de la cuantificación del contenido de (+)-catequina en <i>Struthanthus quercicola</i>

Diagrama

1	Proceso de obtención de (+)-catequina a partir del material vegetal de la especie <i>Struthanthus quercicola</i> .
---	--

III. Lista de figuras

1	Estructura base de un flavonoide (núcleo flavano)
2	Árbol parasitado por <i>Struthanthus quercicola</i> (AGN s.f.)
3	Haustorios de <i>Struthanthus quercicola</i> formados sobre rama de <i>Lingustrum lucidum</i>
4	Hojas de <i>Struthanthus quercicola</i>
5	Imágenes de <i>Cladocolea loniceroides</i> A. Fruto B. Flores C. Hojas
6	A: Hojas y flores de <i>Psittacanthus calyculatus</i> . B: Flores de <i>Psittacanthus calyculatus</i> . San Miguel de Allende, México
7	Parasitación de un árbol por <i>Psittacanthus calyculatus</i> . Mazamitla, Jalisco, México. Costea, M. s.f.
8	Reacción entre el DPPH [•] y el antioxidante para formar el DPPH

Lista de tablas, diagramas y figuras

9	Formación del radical ABTS ^{•+}
10	Reacción de reducción del complejo Fe ⁺³ –TPTZ.
11	RMN ¹ H de la (+)-catequina
12	Curva de calibración de ácido gálico para el ensayo de fenoles totales
13	Curva estándar de Trolox [®] empleada para el ensayo de neutralización del radical DPPH•
14	Actividad inhibitoria del DPPH•. Los datos se encuentran expresados como la media y el error estándar de la media
15	Curva estándar de Trolox [®] para el ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS ^{•+}
16	Actividad inhibitoria del radical catiónico ABTS ^{•+} . Los datos se encuentran expresados como la media y el error estándar de la media
17	Curva estándar de ácido ascórbico para el ensayo FRAP
18	Cromatograma del estándar de (+)-catequina (200 µg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 14.405 min.
19	Cromatograma del estándar de (-)-epicatequina (200 µg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 36.647min.
20	Cromatograma del estándar de (-)-galato de epicatequina (200 µg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 44.154min.
21	Cromatograma del estándar de (-)-galato de epigalocatequina (200 µg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 38.035 min.
22	Curva de calibración de (+)-catequina
23	Cromatograma del extracto metanólico de <i>Psittacanthus calyculatus</i> (40 mg/mL) en condiciones normales de operación (λ=278nm y

Lista de tablas, diagramas y figuras

	$\lambda=254\text{nm}$; temperatura de columna: 25°C ; velocidad de flujo = 0.8 mL/min; fase móvil $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (946.5:50:3.5) y volumen de inyección = $10\mu\text{L}$.
24	Cromatograma del extracto metanólico de <i>Cladocolea loniceroides</i> (40 mg/mL) en condiciones normales de operación.
25	Cromatograma de la fracción F_{P2A} de <i>Struthanthus quercicola</i> (40 mg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención del pico de identificación de (+)-catequina = 13.681 min.

Resumen

Las enfermedades crónico-degenerativas son uno de los mayores retos para las sociedades modernas en materia de salud. Las estadísticas arrojan que el tratamiento de estos padecimientos representa una gran parte del presupuesto que los países destinan a las instituciones salud. Entre este grupo de padecimientos, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial. En décadas recientes se ha comprendido el papel tan importante que el estrés oxidante juega en su desarrollo, por lo cual la búsqueda de nuevos compuestos y fuentes de antioxidantes, ha sido de gran interés en el ámbito científico.

Uno de los usos que los muérdagos han tenido en la medicina tradicional mexicana, ha sido el de tratamiento de enfermedades cardiovasculares; sin embargo, su estudio en materia de antioxidantes no ha sido explorado. Por ello uno de los propósitos del presente trabajo, fue determinar si las especies *Struthanthus quercicola*, *Psittacanthus calyculatus* y *Cladocolea Ioniceroides* tenían potencial antioxidante *in vitro*, utilizando los extractos metanólicos de cada especie. Otro objetivo del estudio fue determinar si estas especies de muérdago poseían catequinas y cuantificarlas en caso de estar presentes.

En nuestros resultados, encontramos que las tres especies de muérdago estudiadas tenían fenoles en su composición. Por otro lado, se determinó que tenían actividad antioxidante al lograr neutralizar los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. De igual forma, los extractos metanólicos de *Struthanthus quercicola*, *Psittacanthus calyculatus* y *Cladocolea Ioniceroides* lograron reducir el ión Fe³⁺ en el ensayo FRAP. Por último, podemos señalar que también tuvieron una buena actividad inhibitoria de la lipoperoxidación.

Respecto al contenido de catequinas, se realizó una cromatografía de líquidos de alta eficiencia y los perfiles cromatográficos indicaron que la especie *Struthanthus quercicola* contenía al flavan-3-ol (+)-catequina. A través de su

cuantificación se determinó que el contenido promedio de (+)-catequina en esta especie fue de 167.3 ± 2.8 mg/Kg de peso seco.

Estos datos nos llevan a concluir que los extractos metanólicos de *Struthanthus quercicola*, *Psittacanthus calyculatus*, *Cladocolea loniceroides*, así como también la (+)-catequina, son buenos candidatos para conducir ensayos *in vivo*, que evalúen si presentan una actividad importante en modelos de estrés oxidante. De igual forma al tener en México una gran variedad de especies de muérdago, se pueden conducir otros estudios para determinar el potencial antioxidante de éstas.

1. Introducción

La creciente urbanización alrededor del mundo, la mejora del transporte y un mayor flujo de la información, han hecho que millones de consumidores alrededor del mundo exijan una mayor calidad y seguridad en los alimentos que consumen. Si bien es cierto que según cifras de la Organización Mundial de la Salud, hoy en día las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la primera causa de muerte en el mundo; es también cierto que existe un aumento en las cifras de consumo de antioxidantes, de suplementos alimenticios y de alimentos que las personas consideran como más sanos o menos perjudiciales. En Estados Unidos, por ejemplo, de 1968 al año 2000, el consumo de carne roja disminuyó en un 17%, la ingesta de pollo aumentó de 21 al 38%, así como también frutas y vegetales tuvieron un aumento de 25% en la ingesta de 1977 a 1999 (Gehlhar y Coyle, 2001).

Estas tendencias responden sin duda, al aumento del interés de las personas por prevenir enfermedades y mejorar su calidad de vida. En este aspecto, los antioxidantes juegan un papel central, puesto que en los últimos años, ha existido una investigación exhaustiva en el ámbito científico para conocer el papel que juegan los antioxidantes en diversas enfermedades. Huang y colaboradores (2005) reportaron que el número de publicaciones que se refieren a los antioxidantes se ha cuadruplicado en una década (1684 artículos en 1993 y 6510 en 2003). Hasta la fecha las investigaciones arrojan que los antioxidantes tienen un rol importante en el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la artritis reumatoide, la diabetes, en el desarrollo de isquemia en heridas y en desórdenes neurológicos como el Alzheimer y el Parkinson (Valko *et al.*, 2007).

Los antioxidantes están presentes de forma natural en una gran variedad de alimentos y bebidas, estos van desde vegetales y frutas hasta chocolates, semillas, vinos, granos, flores, etc. (Cook y Samman, 1996); es decir, son tan

ubiguos que prácticamente diario consumimos alguno al comer. Esto hace que la prevención de algunas enfermedades esté al alcance de la población y no requiera de consumir forzosamente un suplemento alimenticio o medicamento para mejorar nuestra calidad de vida.

De igual forma, en la industria existe la intención de encontrar nuevas fuentes de antioxidantes, de conocer qué fuentes contienen una mayor cantidad de estos, por su gran interés comercial, no solo para su consumo, sino también en la investigación. En el ámbito científico, los antioxidantes son útiles como estándares para identificación y cuantificación, como objeto de estudio en ensayos clínicos y para evaluar en qué dosis es seguro su consumo por los seres humanos. Respecto a este último punto, cabe destacar que la ingesta en exceso de antioxidantes es también perjudicial para la salud, por lo cual debe orientarse a las personas adecuadamente sobre su consumo.

En México, el muérdago representa un grave problema para el bienestar de las poblaciones de árboles. Las especies de muérdago merman la salud del arbolado llevándolos a veces, hasta su muerte. En el Distrito Federal contamos con una gran cantidad de especies de muérdago *Struthanthus quercicola* y *Cladocolea loniceroides* en varias delegaciones como son: Benito Juárez, Cuauhtémoc, Coyoacán, Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Tlalpan, Venustiano Carranza y Xochimilco, según reportó en el 2007 la Secretaría de Medio Ambiente. Por otro lado, *Psittacanthus calyculatus*, es menos abundante que *Struthanthus quercicola* y *Cladocolea loniceroides*; sin embargo, se tienen más registros de su uso en la medicina tradicional.

Por estos motivos el estudio de estas especies de muérdago, pueden revelar la presencia de compuestos que tengan fines terapéuticos o que sean valiosa fuente de antioxidantes. Esto sería muy importante, ya que puede dárseles un uso práctico, a la par que se mejora la salud de las poblaciones de árboles de nuestro país.

2. Antecedentes

2.1 Estrés Oxidante

Las especies reactivas del oxígeno (ERO), así como también las especies reactivas del nitrógeno (ERN), son productos del metabolismo celular que cumplen con ciertas funciones fisiológicas. Idealmente, los organismos han desarrollado sistemas de defensa antioxidante que permiten tener un balance entre la producción de ERO/ERN y su neutralización. No obstante, cuando existe una sobreproducción o una acumulación de estas especies que va más allá de las necesidades inmediatas de la célula, o bien, cuando los mecanismos antioxidantes fallan, se puede producir daño oxidativo a moléculas esenciales como son el ADN, los lípidos y las proteínas que en última instancia repercuten en la integridad celular y en su óptimo funcionamiento. Este fenómeno es conocido como estrés oxidante (Cui *et al.*, 2004).

2.1.2 Radicales libres, Prooxidantes y Especies Reactivas

Los prooxidantes y las ERO, se definen de manera general como sustancias endógenas o exógenas, que tienen la capacidad de llevar a cabo la oxidación de moléculas, ya sea por la abstracción directa de los electrones o de forma indirecta a través de la producción de especies intermedias altamente reactivas. Los radicales libres representan una clase de dichas entidades, son especies que tienen la capacidad de una existencia independiente por un intervalo muy breve de tiempo que posee uno o más electrones desapareados (Alexandre *et al.*, 2012). En la Tabla 1, encontramos un resumen de las principales especies que participan en el estrés oxidante.

Un electrón desapareado es aquél que se encuentra solo en un orbital atómico o molecular. Los electrones son más estables cuando están apareados en orbitales, de ahí que los radicales sean menos estables que los no-radicales, aunque hay variaciones en cuanto a su reactividad.

Tabla 1. Principales moléculas involucradas en el estrés oxidante (Sorg, 2004).

Nombre	Estructura	Reacciones principales
Superóxido	$\bullet\text{O-O}^-$	Reacción de catálisis de Haber-Weiss, reciclando los iones Fe^{3+} , Cu^{2+} ; formación de peróxido de hidrógeno o peroxinitrito.
Peróxido de hidrógeno	HO-OH	Formación del radical hidroxilo; inactivación enzimática; oxidación de biomoléculas.
Radical hidroxilo	$\bullet\text{OH}$	Abstracción de hidrógeno, producción de radicales libres y peróxidos de lípidos; formación de tioles.
Ozono	$\text{O-O}^+=\text{O}$	Oxidación de toda clase de biomoléculas, especialmente aquellas que contienen dobles enlaces, formación de ozónidos y aldehídos citotóxicos.
Singulete de oxígeno	$\text{O}=\text{O}$	Reacción con dobles enlaces; formación de peróxidos; descomposición de aminoácidos y nucleótidos.
Óxido Nítrico	$\bullet\text{N}=\text{O}$	Formación de peroxinitrito; reacciona con otros radicales.
Peroxinitrito	$\text{O}=\text{N-O-O}^-$	Formación del radical hidróxido; oxidación de tioles y grupos aromáticos; conversión de xantina dehidrogenasa a xantina oxidasa; oxidación de biomoléculas.
Radical hipoclorito	ClO^-	Oxidación de grupos que contienen amino y sulfuro; formación de cloruro.
Radical	$\text{R}\bullet$	Abstracción de hidrógeno; formación de radicales peróxido y otros radicales; descomposición de lípidos y otras biomoléculas.
Radical peroxilo	$\text{R-O-O}\bullet$	Abstracción de hidrógeno; descomposición de lípidos y otras biomoléculas.
Hidroperóxido	R-O-OH	Oxidación de biomoléculas; disrupción de membranas biológicas.
Iones de hierro y cobre	Fe^{3+} , Cu^{2+}	Formación de radical hidroxiradical por reacción de Fenton y Haber-Weiss.

2.1.2.1 Especies Reactivas del Oxígeno (ERO)

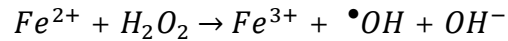
El oxígeno molecular (O_2) es un gas tóxico. La razón por la cual los seres humanos y otras especies aerobias pueden coexistir con este gas, es porque paralelamente a la evolución del sistema de transporte de electrones y otros sistemas enzimáticos que usan el O_2 , se dio la evolución de sistemas antioxidantes que brindan un mecanismo de protección a los efectos tóxicos del O_2 y sus especies reactivas (Aruoma, 1994). ERO es un término general que se utiliza para radicales que provienen del oxígeno y otros no-radicales que son agentes oxidantes o bien, que se convierten fácilmente en radicales ($HOCl$, O_3 , O_2 , H_2O_2). Los radicales que provienen del O_2 , representan la clase más importante de especies radicales generadas en los organismos vivos y se generan a través del metabolismo aerobio principalmente. Otras fuentes importantes son los peroxisomas, microsomas, la activación de células de la inflamación como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), así como otras enzimas que participan en procesos inflamatorios (Buonocore *et al.*, 2010).

El O_2 tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo un radical. La adición de un electrón al O_2 resulta en la formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual es considerado la primer ERO. El 90% del $O_2^{\bullet-}$ intracelular proviene de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Esta cadena de electrones es la principal fuente de ATP, por lo cual es esencial para la vida. Otras fuentes importantes del $O_2^{\bullet-}$ son la NADPH oxidasa (NOX), la Xantina oxidasa, la NADPH→ citocromo P450 oxidasa. La reactividad química del radical $O_2^{\bullet-}$ es débil en medio acuoso; esto aunado al hecho de que su carga electrónica negativa lo hace incapaz de difundirse a través de la membrana lipídica, hace que el $O_2^{\bullet-}$ tenga pocos efectos celulares (Alexandre *et al.*, 2012).

El estado redox de una célula está estrechamente relacionado al estado de oxidación del hierro y está bajo estricto control fisiológico. Se ha propuesto que la adecuada regulación del hierro, evita que exista hierro libre intracelular (Fe^{2+}); sin embargo, *in vivo*, bajo condiciones de estrés, la sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$ provoca

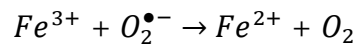
que el hierro se libere de moléculas que contienen este metal. La liberación del hierro ha sido demostrada para las proteínas transportadoras de electrones [4Fe-4S] (Liochev *et al.*, 1994).

El Fe^{2+} liberado puede entonces participar en la reacción de Fenton para producir el radical $\bullet OH$:

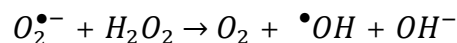


Reacción de Fenton

De tal forma que, bajo condiciones de estrés el radical $O_2^{\bullet-}$ funge como un oxidante de las enzimas [4Fe-4S] facilitando la producción de $\bullet OH$ a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al dejar disponible el ión Fe^{2+} para la reacción de Fenton (Valko *et al.*, 2007). De igual forma, el radical $O_2^{\bullet-}$ participa en la reacción de Haber-Weiss, la cual consiste en dos pasos: Primero se lleva a cabo la reducción de Fe^{3+} por el radical $O_2^{\bullet-}$:



Posteriormente con el ión Fe^{2+} se lleva a cabo la reacción de Fenton. De tal forma que la reacción neta es:



El radical hidroxilo ($\bullet OH$), es la forma neutra del ión hidróxido. El $\bullet OH$ tiene una alta reactividad, lo que hace que sea muy peligroso. Tiene una vida media de 10^{-9} segundos, por lo cual reacciona con las moléculas que se encuentren cercanas a su sitio de origen; ésta es una característica esencial del $\bullet OH$ que al reaccionar con una molécula siempre generará otro radical. Las especies resultantes siempre han tenido menor reactividad que el $\bullet OH$ (Aruoma, 1994). Este radical induce daños oxidativos celulares severos, como son alteraciones del ADN, lo que lo hace una especie altamente mutagénica. Otros daños son la

peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana, lo que aumenta su permeabilidad. El radical $\bullet\text{OH}$ reacciona con las proteínas induciendo su inactivación irreversible (Alexandre *et al.*, 2012).

Ozono. Aunque este gas sirve como protección contra la radiación solar en la atmósfera, es considerado por algunos como el contaminante del aire más tóxico. El ozono puede ser formado en laboratorios que usan equipos con lámparas UV de alta energía, y en el aire urbano, resulta de reacciones fotoquímicas y de la contaminación. El tejido más susceptible de daño es el tracto respiratorio (Aruoma, 1994).

Ácido hipocloroso (HOCl). Aunque no es un radical libre, sí es un potente oxidante. El HOCl ataca primariamente los grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas y puede clorar las bases púricas del ADN (Aruoma, 1994).

Radicales peroxilo. Son formados durante reacciones de oxidación de lípidos, tales como la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que resultan por la descomposición de alimentos ricos en grasas. La reacción puede ser iniciada por cualquier especie que tenga suficiente reactividad para abstraer el átomo de hidrógeno de la cadena lateral de los ácidos grasos insaturados como son el ácido araquidónico y el ácido linoléico, en la membrana lipídica. En la última década, han aumentado los estudios que evalúan su participación en fallas en la reparación del ADN, activación de protooncogenes, así como también en la carcinogénesis (Aruoma, 1994).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula relativamente inactiva que tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares con facilidad y sufrir transformaciones subsecuentes en la presencia de metales de transición (particularmente hierro y cobre), de manera que se generan radicales $\bullet\text{OH}$ altamente reactivos por reacciones de Fenton o Haber-Weiss. Estas

características le permiten afectar la integridad de diversas moléculas en el interior celular (Cochrane, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.1.2.2 Especies Reactivas del Nitrógeno

El óxido nítrico (ON^\bullet) es generado en los tejidos biológicos a través de las óxido nítrico sintasas (NOS, por sus siglas en inglés). El ON^\bullet es un radical abundante, que juega un papel importante en la señalización de una gran variedad de procesos biológicos que incluyen: neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso, regulación inmune, entre otros (Bergendi *et al.*, 1999).

Durante procesos inflamatorios, las células del sistema inmune cuando llevan a cabo el estallido respiratorio producen tanto el $\text{O}_2^{\bullet-}$, como el óxido nítrico (ON^\bullet). Bajo estas condiciones estas dos especies pueden reaccionar para formar el anión peroxinitrito (ONOO^-), un poderoso oxidante responsable de la nitración de proteínas intra y extracelulares como la albúmina, proteínas mitocondriales y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) produciendo así cambios en su estructura y función (Carr *et al.*, 2000).

2.2. Antioxidantes

La exposición a los radicales libres obligó a los organismos a desarrollar mecanismos de defensa. Estos mecanismos que tratan de contrarrestar el estrés oxidante incluyen: mecanismos de prevención, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes.

De acuerdo a la definición propuesta por Halliwell y Gutteridge, un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa, previene o repara el daño oxidativo a una molécula blanco.

2.2.1 Clasificación de los antioxidantes

Existen varias formas de clasificar a los antioxidantes, las más comunes son por el sitio donde ejercen su acción, por su origen y por su fuente.

2.2.1.1 Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

- **Acción Intracelular:** Ejemplos de estos antioxidantes los encontramos en la SOD, la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), proteínas que ligan metales y la glutatión transferasa.
- **Acción a nivel membranal:** Vitamina E, β -caroteno y Ubiquinol-10.
- **Acción a nivel extracelular:** Transferrinas, lactoferrinas, albúmina, vitamina C y ácido úrico.

2.2.1.2 Clasificación según su origen

❖ **Exógenos**

En este grupo principalmente encontramos:

- **Vitamina E:** Es el principal antioxidante liposoluble presente en los tejidos celulares y es considerado la primera línea de defensa contra la peroxidación lipídica. Se ha descrito que juega un papel importante en el buen funcionamiento de las células del sistema inmune (Pekmezci, 2011). Aun cuando existen varias formas de esta vitamina, el cuerpo utiliza principalmente el α -tocoferol (Lokman y Emir, 2011).
- **Vitamina C** (ácido ascórbico). Utilizada principalmente como donador de electrones en la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina del colágeno, por ello, ayuda al fortalecimiento del tejido conectivo y ayuda a la regeneración de las lesiones. Los humanos no pueden producir su propia vitamina C, por lo cual, se debe obtener de la

dieta. Se encuentra en cítricos, jitomate, fresas, pimienta, col y hojas verdes. La vitamina C no puede ser almacenada en el cuerpo, de tal forma que el exceso es excretado por la orina (Lokman y Emir, 2011). La vitamina C al ser hidrosoluble puede reaccionar fácilmente con radicales libres en fluidos extracelulares (Bendich, 1990). Esta vitamina es efectiva en neutralizar $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , $HOCl$, radicales peróxido acuosos y oxígeno singulete (Levine *et al.*, 1999).

➤ Carotenoides. Son antioxidantes liposolubles que reaccionan con ERO, así como también con radicales peróxido. Algunos carotenoides como α -caroteno, γ -caroteno y β -caroteno, pueden ser convertidos a vitamina A (retinol), que posee igualmente propiedades antioxidantes. Se encuentran presentes en zanahorias, jitomate, mantequilla, queso, paprika y salmón rojo (Lokman y Emir, 2011).

➤ Flavonoides

Presentan una importante actividad antioxidante debido a que son quelantes de hierro, atrapan radicales libres, así como también ejercen su acción inhibiendo algunas oxidasas como: la mieloperoxidasa, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa y la xantina oxidasa. Además, estimulan otras importantes enzimas antioxidantes como son la CAT y la SOD (Groot y Rauen, 1998; Sudheesh *et al.*, 1999).

❖ **Endógenos**

Se pueden a su vez subclasificar en:

✓ Enzimáticos

→La enzima más destacada de este grupo es posiblemente la SOD, la cual cataliza la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$, dando como producto O_2 y H_2O_2 .

Todos los miembros de la familia SOD utilizan metales de transición en sus sitios activos, los mamíferos particularmente usan Cu,Zn-SOD (extracelular y en el citoplasma) y Mn-SOD (que se presenta en la mitocondria).

→Catalasa (CAT) Forma parte importante del sistema antioxidante CAT/SOD, el cual actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂. Se encuentra en el hígado, riñones y en baja concentración en tejido conectivo y epitelios. A nivel celular se encuentra en mitocondria, peroxisomas y en el citosol de los eritrocitos (Gutiérrez, 2002).

→Glutación peroxidasa (GPx). Enzima que tiene como cofactor al selenio y que cataliza la reducción del H₂O₂ y de lipoperóxidos (L-OOH). Se localiza en: citosol (eritrocitos), lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune (Cisneros,1995).

✓ No enzimáticos

Este grupo está representado por el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), glutación (GSH), carotenoides, flavonoides, entre otros (Valko *et al.*, 2007). Estos antioxidantes pueden clasificarse a su vez en antioxidantes de acción indirecta o directa. Los de acción indirecta son agentes quelantes y los de acción directa pueden ser aquellos que atrapan radicales libres. (Dorado *et al.*, 2003).

2.2.1.3 Clasificación de los antioxidantes por su fuente de obtención

- **Naturales:** En los últimos años han aumentado el número de investigaciones orientadas a estudiar plantas que puedan tener sustancias antioxidantes potenciales; esto se da por el creciente

interés de las personas de disminuir la ingesta de sustancias sintéticas. Entre los principales antioxidantes naturales están el ácido ascórbico, los tocoferoles, los flavonoides y los carotenoides.

- **Sintéticos:** Se emplean principalmente en la industria de los alimentos como conservadores; sin embargo, son pocos los que se utilizan ya que debe descartarse la posibilidad que sean tóxicos o carcinogénicos. Los más utilizados son: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP) y terbutil hidroquinona (TBHQ).

2.2.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular producto del metabolismo secundario en plantas, que tienen como base el núcleo flavano. Este consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, los cuales normalmente se condensan y forman un anillo pirano (Fig. 1).

Son compuestos ubicuos que encontramos en una gran diversidad de plantas y alimentos como son: chocolate, té, vino tinto, frutas, nueces, semillas, etc. Los flavonoides son responsables del color de las frutas y vegetales, aunque también existen casos de flavonoides incoloros en la naturaleza como por ejemplo, los rotenoides (Lotito y Frei, 2006).

En la industria han sido utilizados en los últimos años como antioxidantes naturales en aceites para protegerlos de la peroxidación lipídica, como suplemento alimenticio y como agente antimicrobiano. Por otra parte, vasto es el estudio que se ha hecho de sus potenciales efectos biológicos que incluyen entre ellos propiedades antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias, antialérgicas, acción vasodilatadora, inhibición de la peroxidación lipídica, inhibición de la agregación plaquetaria, así como también inhibidores de la permeabilidad capilar y de la actividad enzimática (como es inhibición de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa) (Cook y Samman, 1996).

Los flavonoides se subdividen habitualmente en flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianidinas (Tabla 2), en función de sus características estructurales (Heim *et al.*, 2002).

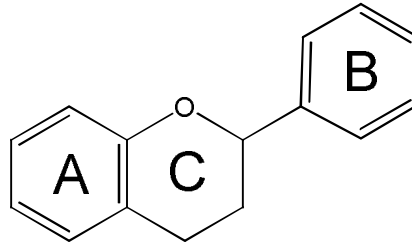
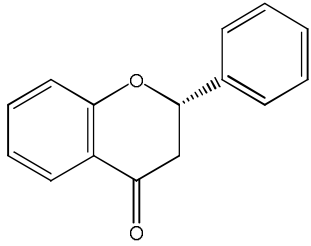
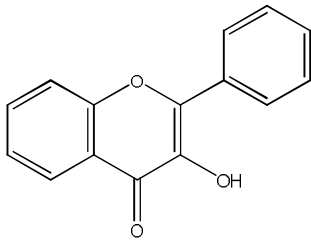
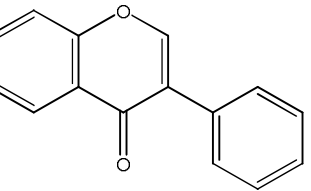
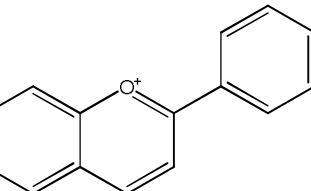


Figura 1. Estructura base de un flavonoide (núcleo flavano).

Tabla 2. Clasificación de los flavonoides (Heim *et al.*, 2002)

Clase	Estructura básica	Ejemplos de flavonoide	Fuentes de obtención en la dieta
Flavonas		Crisina Apigenina Rutina	Cilantro, perejil, vino tinto, cáscara de frutas, cítricos, cáscara de jitomate
Flavanoles		(+)-catequina (-)-epicatequina epigallocatequina	Té (<i>Camellia sinensis</i>) y vino tinto

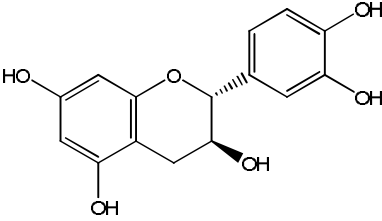
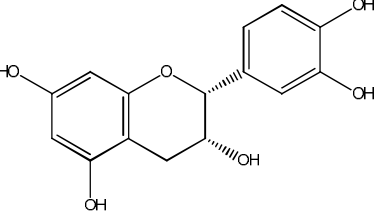
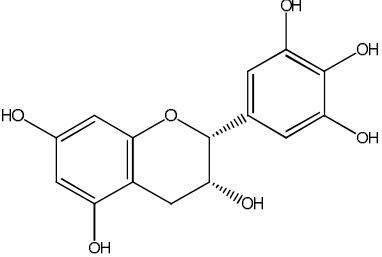
Flavanonas		Naringina Naringenina Hesperidina Hesperetina	Cítricos (toronja, limón, naranja)
Flavonoles		Quercetina caempferol	Brócoli, granada, té negro, cebolla, lechuga, jitomate, bayas, aceite de oliva, cáscara de manzana.
Isoflavona		Genisteína Genistina Daidzina Daidzeína	Soya
Antocianidinas		Apigenidina Cianidina Malvidina	Frutas coloreadas (cereza, frambuesa, fresa, uva, mora azul) y vino tinto

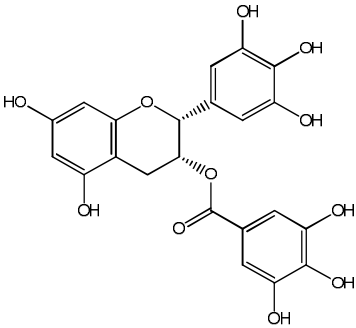
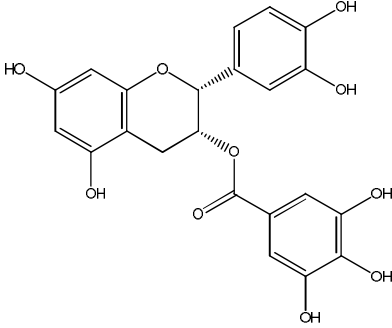
2.2.2.1 Catequinas

Las catequinas se clasifican dentro del grupo de los flavanoles, llamados también proantocianidinas o flavan-3-oles. Este grupo de flavonoides incluye a la catequina, epicatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina

(Tabla 3). En la naturaleza, encontramos que estos compuestos están presentes en frutas como cerezas, manzanas, ciruelas, fresas; semillas y granos como la cocoa, vegetales, en el vino tinto, en el té negro, así como también en el té oolong. De igual manera, forman protoantocianidinas diméricas, triméricas y oligoméricas en las uvas, incluyendo la cáscara y las semillas (Yilmaz, 2006).

Tabla 3. Estructura y actividad antioxidante de las principales catequinas.

Nombre	Estructura	Actividad antioxidante reportada	Referencias
(+)-catequina		Presenta actividad estabilizadora del O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} , peroxilo, y $DPPH^{\bullet}$. De igual forma se ha reportado que actúa como quelante de hierro.	(Fukumoto y Mazza, 2000), (Morel <i>et al.</i> , 1993), (Scott <i>et al.</i> , 1993) y (Yilmaz, 2006).
(-)-epicatequina		Al igual que la (+)-catequina, la (-)-epicatequina estabiliza radicales O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} , peroxilo y $DPPH^{\bullet}$.	(Bors y Michel, 1999), (Liu <i>et al.</i> , 2000), (Fukumoto y Mazza, 2000).
(-)-epigallocatequina		Estabiliza al radical $DPPH^{\bullet}$, inhibe la lipoperoxidación.	(Yilmaz, 2006).

<p>(-)-galato de epigalocatequina</p>		<p>Son más efectivos que la (-)-epicatequina y la (+)-catequina en llevar a cabo la estabilización de radicales en la peroxidación lipídica.</p>	<p>(Yanagawa <i>et al.</i>, 2003), (Shahidi y Alexander, 1998).</p>
<p>(-)-galato de epicatequina</p>		<p>Poseen actividad antimicrobiana (contra <i>H. pylori</i>)</p>	

2.3 Muérdago

2.3.1 Generalidades de la familia Loranthaceae

La familia Loranthaceae es la más grande de las angiospermas parásitas con 950 especies. Se encuentra distribuida en latitudes sur y zonas tropicales. Las hemiparásitas de esta familia son conocidas popularmente con el nombre de muérdagos (Norton y Carpenter, 1998). Los muérdagos son especies hemiparasitarias fotosintéticas que obtienen agua, nutrientes y soporte de las plantas a través de estructuras conocidas como haustorios que penetran hasta el xilema del hospedero; esto provoca el decaimiento del árbol parasitado hasta su muerte, o bien, lo deja vulnerable a ataques por otros agentes como pueden ser insectos, hongos y bacterias. Algunos muérdagos crecen sobre las copas de los

árboles y los arbustos de sus hospederos disminuyendo así su capacidad fotosintética (Herrera, 2005). Se encuentran en varios ecosistemas incluyendo bosques boreales, selvas tropicales y zonas áridas. Mientras algunas semillas de plantas germinan solo en respuesta a señales químicas del huésped, el muérdago germina en casi cualquier situación. Todos los muérdagos toman los nutrientes y el agua de su hospedero, pero difieren en que no todas las especies toman de éste el carbono que requieren (Norton y Carpenter, 1998).

Los frutos son carnosos con una capa pegajosa y gruesa de mucílago que rodea a la semilla, esta capa permite su adherencia a los pájaros, propiciando su propagación a los distintos árboles (Pérez *et al.*, 2006).

2.3.2 Distribución geográfica

En recientes años en México, las poblaciones de árboles que se ven afectadas por especies de muérdago han ido en aumento. El parasitismo causado por muérdagos incluye ecosistemas templados y tropicales; se tienen reportados 10 géneros y más de 151 especies en los diversos ecosistemas de nuestro país (Cházaro *et al.*, 1991).

El muérdago se encuentra distribuido en toda la República Mexicana, contando con mayor número de especies en Oaxaca, Chiapas y Veracruz (Cházaro, 1987).

Durante un estudio realizado en 2007 por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), el Colegio de Posgraduados (COLPOS), la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa (UAM-I) y la Secretaría del Medio Ambiente, se llevó a cabo la identificación de especies de muérdago presentes en la zona urbana del Distrito Federal; se encontraron siete especies principales que afectan el arbolado urbano: *Cladocolea loniceroides*, *Cladocolea diversifolia*, *Struthanthus interruptus*, *Struthanthus quercicola*, *Struthanthus depeanus*, *Phoradendron velutinum* y *Phoradendron brachistachium*; siendo la especie *Struthanthus interruptus* la que presenta mayor incidencia en las áreas verdes urbanas de la zona norte, seguido

de *Cladocolea loniceroides* que actualmente se encuentra más allá del centro del Distrito Federal.

De igual forma se encontró que la distribución del muérdago se presenta de manera predominante en las delegaciones Benito Juárez, Cuauhtémoc y Coyoacán, con tendencia predominante hacia las delegaciones localizadas en el suroeste de la Ciudad de México (delegaciones Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Tlalpan, Venustiano Carranza y Xochimilco). Los géneros de árboles con mayor infestación de muérdago son: *Fraxinus* (fresno), *Populus* (álamo), *Ulmus* (olmo), *Ligustrum* (trueno), *Alnus* (aile) y *Acacia* (acacia) (SMA, 2007).

2.3.3 Importancia de su estudio

A nivel mundial, los muérdagos de la familia Loranthaceae son empleados en la medicina tradicional (Ratera y Ratera, 1980). Entre las propiedades que se han reportado para los miembros de esta familia de plantas destacan los estudios de Zee Cheng (1997), así como también los de Park y colaboradores (1998, 1999) donde se describen propiedades antitumorales. También encontramos reportes de propiedades inmunomodulatorias en los estudios de Fernández y colaboradores (1998); de actividad antiinflamatoria en las investigaciones de Hostanska y colaboradores (1995). Finalmente en la literatura podemos hallar evidencia de algunos muérdagos de la familia Loranthaceae con actividad antimicrobiana (Amabeoku *et al.*, 1998) y antihipertensiva (Fukunaga *et al.*, 1989; Taira *et al.*, 1994).

2.3.4 Compuestos reportados en especies de muérdago (Loranthaceae)

Diversos estudios realizados a distintas especies con el fin de obtener sus propiedades químicas y farmacológicas, han reportado que éstas presentan compuestos de distinta naturaleza como son flavonoides, alcaloides, lectinas, viscotoxinas, histamina y polisacáridos (Winterfeld y Dorle, 1942; Yataro, 1941;

Sajner y Veris, 1958; Graziano *et al.*, 1967; Jordan y Wagner, 1986; Fukunaga *et al.*, 198; Sinha *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999).

2.3.5 *Struthanthus quercicola*

Sus características botánicas son las siguientes: lampiño, ramas lisas y cilíndricas que se van haciendo más delgadas hacia el final de éstas; hojas casi opuestas, ovoides, puntiagudas, pecioladas (que se unen al tallo principal mediante un tallo propio), laminares, con venación reticulada; racimos axilares; flores casi unidas al tallo, opuestas, con anteras cilíndricas que se fijan a la base (Don, 1934)

Se ha observado en *Struthanthus quercicola* la parasitación preferente de truenos (*Ligustrum lucidum* y *Ligustrum japonicum*), jacarandas (*Jacaranda mimosaeifolia*), alamillos (*Populus spp.*), ahuehuetes (*Taxodium mucronatum*), limón (*Citrus limon*), sauce llorón (*Salix babylonica*), álamo blanco (*Populus alba*) (Fig. 2), álamo americano (*Populus deltoides*) (AMA, 2009), entre otros.

Una vez que germina la semilla en el hospedero, el parásito forma ramas propias que se pegan a las ramas de los árboles, uniéndose a éstas a través de los haustorios (Fig. 3). Las ramas se van ramificando en forma dicotómica, formando un follaje denso, que llega a cubrir la copa del hospedero (Fig. 4) (Pérez, *et al.*, 2006).

Para esta especie en particular, no hay registro de su uso en la medicina tradicional. Sin embargo, cabe destacar que para *Struthanthus venetus* (especie que comúnmente se confunde con *Struthanthus quercicola*) encontramos registros de su uso para tratar la tos y producir sedación (Pérez, 2004).



Figura 2. *Populus alba* parasitado por *Struthanthus quercicola* (AGN s.f.)



Figura 3. Haustorios de *Struthanthus quercicola* formados sobre rama de *Lingustrum lucidum*.



Figura 4. Hojas de *Struthanthus quercicola*

2.3.6 *Cladocolea loniceroides*

Los principales estados donde tiene presencia son: Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos y Oaxaca, parasitando alrededor de 22 especies de árboles distintas (Cházaro, 1987).

Cladocolea loniceroides presenta arbustos dioicos, parásitos de plantas leñosas, con tallos cilíndricos o aplanados, erguidos o volubles; hojas laminares alternas; flores dispuestas en racimos, de tal forma que todas las flores quedan a la misma altura (corimbos); presentan inflorescencias (Fig. 5). Pueden presentar raíces epicorticales (que les permiten formar los haustorios secundarios) sobre el tallo, en la base de la planta o estar ausentes. Las semillas tienen un promedio de germinación de 21 días (Alvarado y Saavedra, 2005).

Cuando la semilla de esta especie se implanta, el embrión forma el haustorio hacia el interior del árbol y hacia la superficie del tronco grueso, ramificándose en abundancia en forma dicotómica, cada rama forma entonces nuevas ramas, donde cada una tiene abundantes hojas (Pérez *et al.*, 2006).

El caso más conocido de parasitación por esta especie de muérdago en nuestro país, se dio en la población de ahuejotes (*Salix bonplandiana* y *Salix humboltiana*) de la zona chinampera de Xochimilco, donde *Cladocolea loniceroides* disminuyó considerablemente el vigor y estética de los árboles (Saavedra *et al.*, 2005).

Para *Cladocolea loniceroides*, no se encuentra documentado en la literatura un uso en la medicina tradicional. Sin embargo, estudios realizados por Serrano y colaboradores, han determinado que tiene actividad antioxidante y efecto citotóxico (Serrano *et al.*, 2011).

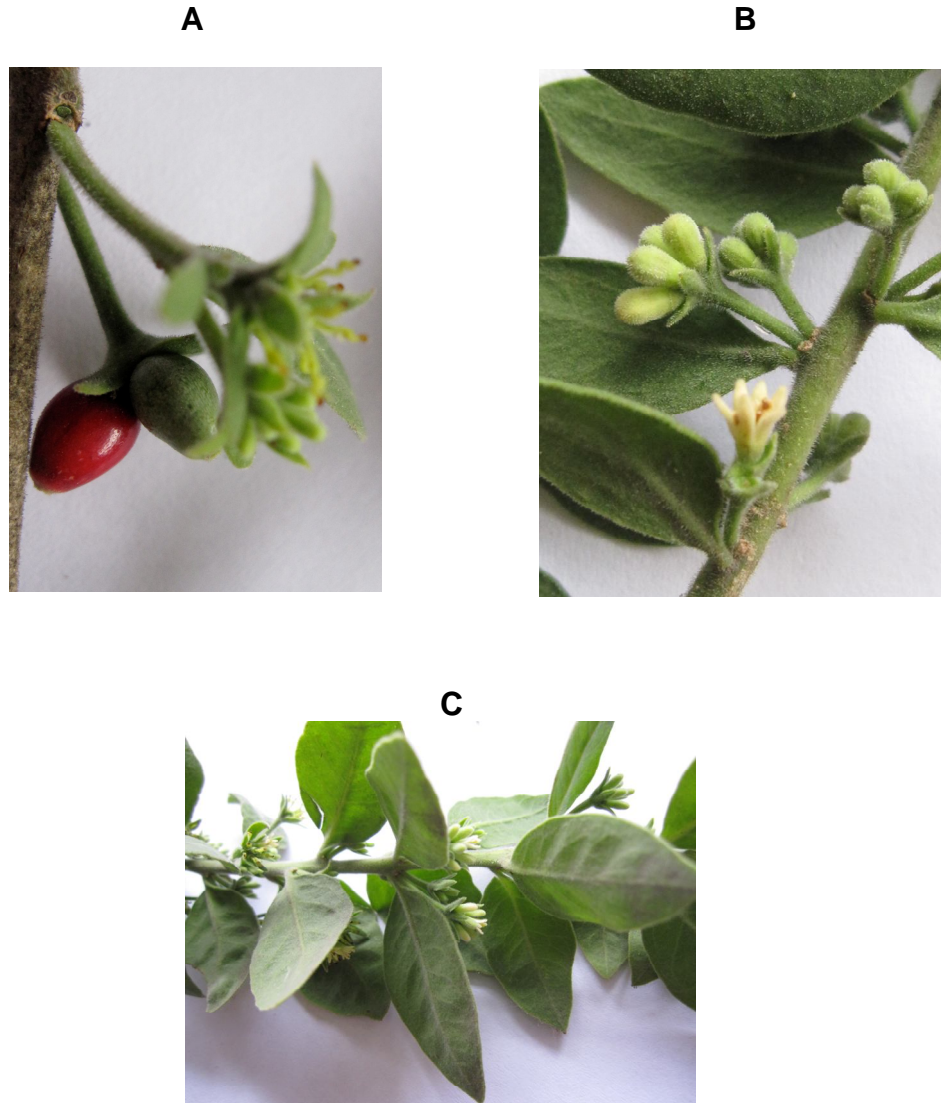


Figura 5. Imágenes de *Cladocolea loniceroides* **A.** Fruto **B.** Flores **C.** Hojas

2.3.7 *Psittacanthus calyculatus*

Es una planta hemiparásita que crece en una gran variedad de plantas silvestres o cultivadas, que abarcan las familias Rutaceae, Leguminosae, Fabaceae, Conniferae, Fagaceae, Myrtaceae (*Eucalyptus*) y Pinaceae, las cuales en su mayoría son árboles de frutos o que son utilizadas por su madera (Fig. 7).

Se han encontrado árboles parasitados por *Psittacanthus calyculatus* en Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca,

Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán (Villaseñor, 1998).

Sus características botánicas son las siguientes: presentan tallos verdes angulados, generalmente muy ramificados; sus hojas son opuestas, de color verde oscuro, con consistencia de cuero, tienen forma elíptica, son algo curvadas y su inflorescencia es terminal; las flores son vistosas, formado por un triadas, tiene sus botones característicamente curvados, alrededor de 4 cm de largos ensanchados en la parte superior y presentan un color rojo a anaranjado (Fig. 6).

Durante años, *Psittacanthus calyculatus* ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana. En Oaxaca y Puebla, es frecuente su uso en trastornos ginecobstétricos. En Oaxaca, también se emplea para la menorragia, la esterilidad y como antiabortivo, la planta entera se remoja en agua o aguardiente y se administra por vía oral. En Quintana Roo, para curar las inflamaciones se muele la planta.

Se dice en la medicina tradicional que el remedio hecho con este injerto, tiene la propiedad de "enfriar la sangre", restaurando así el equilibrio frío-calor del cuerpo; por lo tanto, evita el aborto, recupera la fertilidad y detiene las hemorragias menstruales. También se cree que puede ser útil para sanar heridas (inclusive para desinfectarlas), aliviar inflamaciones, salpullido y quemaduras; de igual forma se dice que detiene las hemorragias, y es útil para curar los riñones, la diabetes y contra la caída del cabello.

En Tabasco preparan un té, con las hojas, para beberlo contra los parásitos. Este té, elaborado junto con raíz de calaguala, lo usan contra la diarrea. Las hojas sólo machacadas con agua, las ocupan para lavar los ojos en casos de conjuntivitis (UNAM, 2009).

En un estudio farmacológico, un extracto de *Psittacanthus calyculatus* recolectado de *Prosopis laevigata*, produjo una mayor vasorelajación que la

inducida por la acetilcolina. A pesar de que se tienen varios usos de esta especie en la medicina tradicional, la fitoquímica de la planta está pobremente documentada (Bah *et al.*, 2011).



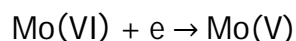
Figura 6. A: Hojas y flores de *Psittacanthus calyculatus*. B: Flores de *Psittacanthus calyculatus*. San Miguel de Allende, México. Tarrant, D. 2007.



Figura 7. Parasitación de un árbol por *Psittacanthus calyculatus*. Mazamitla, Jalisco, México. Costea, M. s.f.

2.4 Determinación del contenido de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino, la transferencia se da de los compuestos fenólicos a los complejos de ácidos fosfomolibdicos/fosfotúngsticos de tal forma que se crean complejos de color azul. La naturaleza química del reactivo de Folin-Ciocalteu no se conoce con precisión; sin embargo, se cree que reacciones reversibles de reducciones secuenciales de uno o dos electrones llevan a la aparición del color azul, posiblemente por $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. Básicamente se cree que el molibdeno es el que más fácilmente se reduce en el complejo, con lo cual se da una reacción de transferencia de electrones entre los reductores y el Mo(VI) (Huang *et al.*, 2005).



Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu en condiciones básicas, ajustando la solución a pH~10 con carbonato de sodio (Huang *et al.*, 2005).

2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

2.5.1 Método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•)

El ensayo DPPH se basa en que un donador de electrones puede actuar como antioxidante.

En esta prueba se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra ante el radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•) midiendo espectrofotométricamente la desaparición de éste. El DPPH• muestra una absorbancia máxima a una longitud de onda de 517 nm, presentando un característico color morado. Una vez que el radical adquiere un radical hidrógeno del antioxidante, se forma el DPPH y el color de la solución se vuelve amarillo (Fig. 8). La reacción es estequiométrica con

respecto al número de átomos de hidrógeno que se absorben, de ahí que la reacción se pueda monitorear mediante la disminución de la absorbancia a 517 nm (Moon y Shibamoto, 2009).

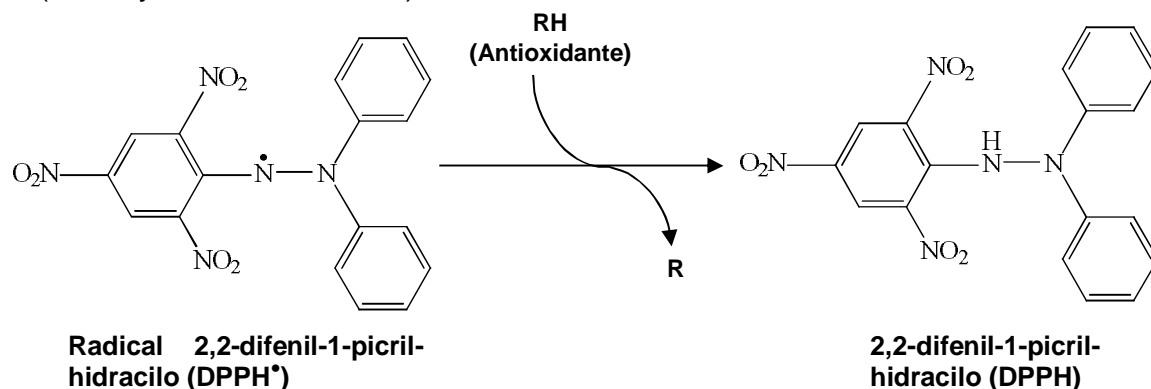


Figura 8. Reacción entre el DPPH[•] y el antioxidante para formar el DPPH.

2.5.2 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS^{•+})

En este ensayo el catión radical se genera a través de la oxidación del ABTS por el persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). El radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ presenta un máximo de absorbancia a 734 nm y presenta un cambio de coloración tras haber reaccionado con el antioxidante, de tal forma que el remanente del radical no neutralizado puede ser cuantificado (Fig. 9). La absorbancia de la mezcla de reacción del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y el antioxidante se comparan con la absorbancia del estándar de Trolox y los resultados se expresan en términos de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) (Moon y Shibamoto, 2009).

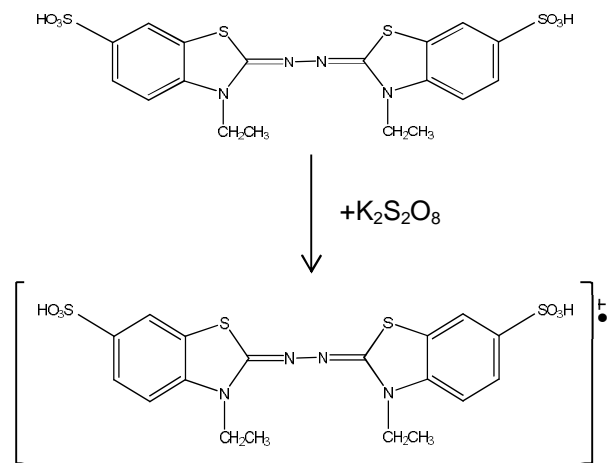


Figura 9. Formación del radical $ABTS^{\bullet+}$

2.5.3 Ensayo del poder antioxidante/reductor del ion férrico (FRAP)

El complejo $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ (donde TPTZ es 2,4,6-tripiridil-s-triazina) en condiciones de acidez, al reaccionar con un antioxidante se reduce a Fe^{2+} -TPTZ, dando como resultado un color azul intenso con un máximo de absorbancia a 593 nm (Fig. 10). De tal forma que el efecto antioxidante (habilidad reductora) se puede conocer monitoreando la formación de Fe^{2+} -TPTZ con un espectrofotómetro a dicha longitud de onda (Moon y Shibamoto, 2009).

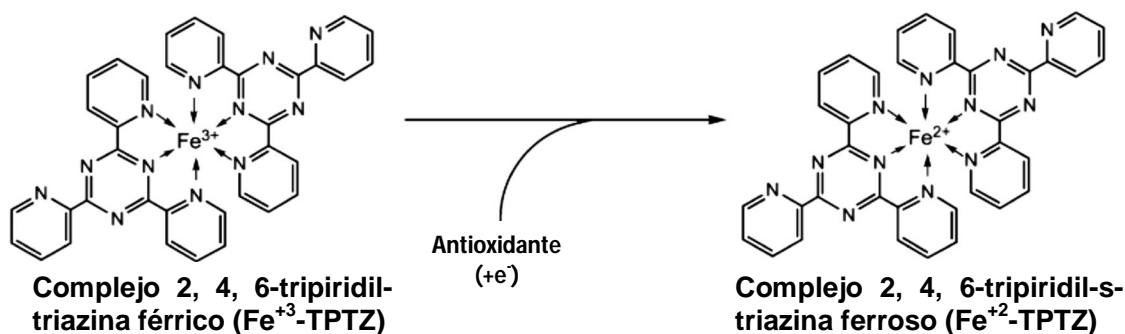


Figura 10. Reacción de reducción del complejo Fe^{+3} -TPTZ.

2.5.4 Ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

Se basa el hecho de que lípidos como el ácido linoléico forman el radical peroxilo (LOO^\bullet) en presencia de ERO y O_2 . Este radical reacciona con el β -caroteno para formar el radical estable β -caroteno en la solución de ensayo. Si está presente un antioxidante en la solución, reacciona competitivamente con el LOO^\bullet . Por ello los efectos antioxidantes se monitorean con facilidad por el blanqueamiento del color en la solución prueba con un espectrofotómetro a 470 nm, que representa la absorbancia típica del β -caroteno (Tsuchihashi *et al.*, 1995).

3. Justificación

De acuerdo a la OMS se ha determinado que las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causas de muerte en el mundo. Este organismo reporta que en 2008 murieron por esta causa alrededor de 17.3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo. Las enfermedades cardiovasculares afectan por igual a ambos sexos, presentando una mayor incidencia en países de bajos y medios ingresos (OMS, 2008).

Sin embargo, mientras en la mayoría de los países con dietas ricas en grasas y carbohidratos se ve una correlación positiva entre estos hábitos y las ECV; en el sur de Francia, donde los habitantes comúnmente se alimentan de mantequilla, pan y muchas proteínas, curiosamente se observó que tenían una gran longevidad, así como también, baja incidencia en ECV. Este hecho se conoce como la Paradoja Francesa y se ha observado en otras poblaciones del mediterráneo. Al realizar estudios epidemiológicos se reveló que estas poblaciones igualmente consumen una alta cantidad de flavonoides en su dieta a través de vegetales, vino tinto y frutas; por lo cual, su alto consumo de grasas, los afecta en menor medida que al resto de las personas (Burr, 1995).

En México, la prevención de enfermedades no forma una parte importante de la cultura de la población, siendo común que las personas desde la infancia coman en exceso, tengan una pobre ingesta de vegetales y una baja actividad física. A estos factores de riesgo, se le puede sumar el tabaquismo, con lo cual se incrementa la posibilidad de que muchos mexicanos padezcan sobrepeso, hipertensión e hiperlipidemia, los cuales son factores clave para desarrollar una ECV.

Por todo lo anterior, en los últimos años se ha llevado a cabo una investigación intensa para entender mejor cómo se desarrollan las enfermedades

cardiovasculares, así como también, se han orientado esfuerzos hacia la prevención y la obtención de tratamientos más eficaces. Parte importante de estas investigaciones va dirigida hacia el estudio de los flavonoides y sus actividades antioxidantes. Esto es muy importante, ya que estos estudios pueden revelar cuáles son los alimentos que mayor cantidad de flavonoides tienen y que están al alcance de la población, de tal forma que pueda fomentarse su consumo. De igual forma, encontrar especies vegetales que aunque no se consuman habitualmente, tengan una cantidad importante de antioxidantes, permitiría reconocer fuentes potenciales de aislamiento de estos compuestos; hecho que resulta de interés en la investigación y en la industria farmacéutica.

En la medicina tradicional los muérdagos han sido utilizados principalmente para tratar enfermedades cardiovasculares, cáncer, como antiséptico y como remedio contra la alopecia (Rodríguez *et al.*, 2003). Por otro lado, en la literatura encontramos que existen varios compuestos reportados para los muérdagos de la familia Loranthaceae como son: flavonoides, alcaloides, lectinas y viscotoxinas, histamina y polisacáridos (Winterfeld y Dorle, 1942; Yataro, 1941; Sajner y Veris, 1958; Graziano *et al.*, 1967; Jordan y Wagner, 1986; Fukunaga *et al.*, 198; Sinha *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999).

En nuestro grupo de investigación en un estudio previo se aisló como responsable de la actividad vasorrelajante encontrada en *Psittacanthus calyculatus* al flavan-3-ol catequina.

Con base en estos antecedentes se planteó como objetivo primordial del presente proyecto de investigación determinar la concentración de catequina en los extractos metanólicos de *Struthanthus quercicola*, *Cladocolea loniceroides* y *Psittacanthus calyculatus*.

Para el cumplimiento del objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Revisión bibliográfica de la información disponible de las especies de muérdago *Struthanthus quercicola*, *Cladocolea loniceroides* y *Psittacanthus calyculatus*.
2. Realizar extractos metanólicos de las especies a evaluar para poder llevar a cabo los estudios de potencial antioxidante, así como de identificación de catequinas a través de una Cromatografía Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).
3. Llevar a cabo el aislamiento de la (+)-catequina encontrada mediante CLAE en la especie *Struthanthus quercicola*.
4. Cuantificar las catequinas en la fracción F_{P2A} de *Struthanthus quercicola* por medio de CLAE.

4. Desarrollo Experimental

4.1. Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1% seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos.

Se llevaron a cabo dos cromatografías en columna abierta (CCA). La primera se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM empacado en columna abierta de vidrio y utilizando como fase móvil una mezcla de AcOEt:MeOH de polaridad creciente. La segunda cromatografía se realizó sobre Sephadex LH-20 (Merck) empacado en una columna de vidrio (3.5 × 50).

4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 100 Hz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV. Los espectros se realizaron utilizando metanol deuterado (CD₃OD) y tetrametilsilano (TMS) como referencia, reportando los desplazamientos químicos en ppm.

4.3 Material Vegetal

La especie de muérdago *Struthanthus quercicola* utilizado en este estudio fue recolectado a partir de un trueno (*Ligustrum lucidum*) parasitado. Por otro lado, la especie *Cladocolea loniceroides* se obtuvo de un fresno (*Fraxinus uhdei*) parasitado. Esta recolección se llevó a cabo en la zona del Instituto de Química en el Campus de Ciudad Universitaria, Coyoacán, Distrito Federal. La especie *Psittacanthus calyculatus* se recolectó a partir de *Prosopis laevigata* (Mesquite) en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México.

Una muestra de referencia de los materiales vegetales se resguardan en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. El material vegetal fue identificado como *Struthanthus quercicola* y *Cladocolea loniceroides* por el biólogo Bonifacio Don Juan del Jardín Botánico Faustino Miranda UNAM. Por otra parte, la especie *Psittacanthus calyculatus* fue identificada por la Dra. Mahinda Martínez de la Universidad Autónoma de Querétaro.

4.4 Obtención de los extractos

4.4.1 Proceso de extracción para las especies *Cladocolea loniceroides* y *Psittacanthus calyculatus*

Las hojas de los muérdagos se dejaron al aire libre para su secado y posteriormente se molieron con un molino C4. Tras este proceso, se maceraron las hojas secas por 72 h en MeOH. El material vegetal se separó por filtración y los extractos resultantes se concentraron al vacío independientemente. El disolvente fue recuperado y se repitió el proceso dos veces más. Como resultado de este proceso se obtuvieron los extractos de *Cladocolea loniceroides* y *Psittacanthus calyculatus*. Los extractos se identificaron con las claves Cl_M y Pc_M.

4.4.2 Proceso de extracción para la especie *Struthanthus quercicola*

Las hojas de muérdago (*Struthanthus quercicola*) se dejaron al aire libre para su secado y posteriormente se molieron con un molino C4. Se obtuvieron 423.07 g de hojas tras la molienda, que se dejaron macerar por 72 h en MeOH. El material vegetal se separó por filtración y el extracto resultante se concentró al vacío, obteniéndose un sólido viscoso café oscuro. El disolvente fue recuperado y se repitió el proceso de maceración-concentración. Al final se obtuvo un solo extracto que fue etiquetado con la clave Sq_M (Diagrama 1).

4.4.3 Fraccionamiento primario

El sólido resultante Sq_M (20.33 g), se resuspendió en una mezcla H₂O-MeOH (90:10), posteriormente fue sometido a un fraccionamiento primario llevando a cabo una partición con 250 mL de hexano, este paso se realizó por triplicado. Las fracciones obtenidas de la partición se concentraron al vacío y se identificaron como F_{P1H} y F_{P2H}. A continuación, la fracción F_{P1H} fue sometida a un fraccionamiento con 250 mL de AcOEt, llevándose a cabo este proceso por triplicado. Las fracciones obtenidas, se concentraron y se identificaron con las claves F_{P1A} y F_{P2A}.

4.4.4 Fraccionamiento secundario

La fracción F_{P2A} (2.18g) fue sometida a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta, utilizando gel de sílice como adsorbente y como sistema de elución, se emplearon mezclas de AcOEt-MeOH de polaridad creciente. De este fraccionamiento se obtuvieron 71 fracciones de 50mL, las cuales se concentraron al vacío por separado. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina y las fracciones que presentaban similitud cromatográfica se unieron para formar seis grupos de fracciones primarias (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de las fracciones obtenidas a partir de la fracción F_{P2A}

Sistema de elución	Fracciones Reunidas	Clave
AcOEt:MeOH	1	F_{MI}
	2-3	F_{MII}
	4-21	F_{MIII}
	22-33	F_{MIV}
	34-37	F_{MV}
	38-71	F_{MVI}

4.4.5 Obtención de la (+)-catequina, a partir de la fracción F_{MII}

La fracción F_{MII} (0.4331 mg) se disolvió en una mínima parte de MeOH. Se montó una columna de Sephadex LH-20 y se vertió la fracción disuelta en la columna. La fase móvil empleada fue MeOH. Se obtuvieron 26 fracciones de 15 mL las cuales fueron reunidas por similitud cromatográfica en cuatro grupos de fracciones (Tabla 5). De la fracción F_{MII-1} precipitó un compuesto color amarillo claro (S_{Q-C001}) que fue identificado por técnicas espectroscópicas y espectrométricas como (+)-catequina (Diagrama 1). RMN- 1H (400 MHz, MeOH- d_6) δ (ppm): δ 4.81 (s, H-2); 4.17 (m, H-13); 5.95 (d, $J= 2.4$, H-6); 5.92 (d, $J= 2.4$, H-8); 6.98 (d, $J= 2.0$ H-2'); 6.76 (d, $J= 8.0$, H-5'); 6.81 (dd, $J= 8.0, 2.0$, H-6'), H-4 α ($J= 16.4, 3.6$), H-4 β ($J= 16.4, 3.6$). RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_6) δ (ppm): 156.56 (C-7), 156.22 (C-9), 155.93 (C-5), 144.50 (C-3'), 144.34 (C-4'), 130.85 (C-1'), 117.98 (C-2'), 114.47 (C-6'), 113.89 (C-5'), 98.66 (C-10), 94.97 (C-6), 78.45 (C-3), 78.43 (C-3), 66.06 (C-2), 27.83 (C-4) (Davies, *et al.*, 1996).

Tabla 5. Resumen de las fracciones reunidas durante el fraccionamiento de F_{MII} .

Sistema de elución	Fracciones Reunidas	Clave
Metanol	1-12	F_{MII-1}
	13-16	F_{MII-2}
	17-21	F_{MII-3}
	22-26	F_{MII-4}

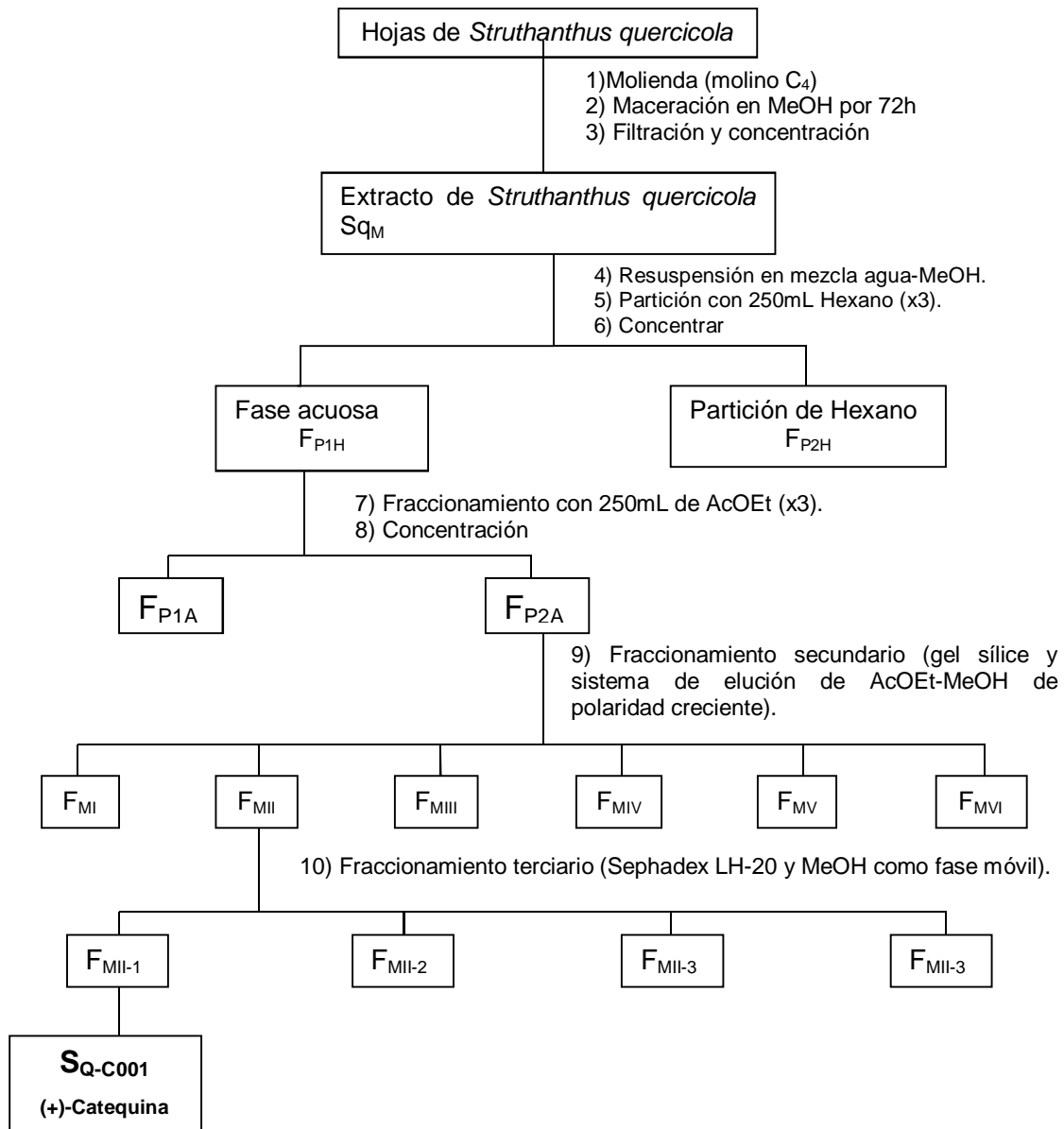


Diagrama 1. Proceso de obtención de (+)-catequina a partir del material vegetal de la especie *Struthanthus quercicola*.

4.5 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se utilizó el método descrito por Singleton y colaboradores (1965) con algunas modificaciones. En una placa de ELISA DE 96 pozos se adicionaron por triplicado 160 μL de H_2O desionizada por pozo, 20 μL de cada extracto de muérdago a 1 mg/mL en metanol y 20 μL del reactivo de Folin. Esta solución se dejó reposar en la oscuridad por 8 minutos, posteriormente se adicionaron 10 μL Na_2CO_3 al 20% y la mezcla de reacción se dejó reposar por 1 h en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se realizó una lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Se realizó una curva de calibración con estándares de ácido gálico.

4.6 Evaluación de la actividad antioxidante

A través de evaluar la capacidad para estabilizar el radical DPPH y el catión ABTS, y de la capacidad reductora del Fe^{3+} (FRAP) se determinó si los extractos indicados poseen capacidad antioxidante. Para el ensayo del radical DPPH y ABTS se obtuvieron los TEAC y porcentaje de inhibición del radical; mientras que para el ensayo de FRAP se obtuvieron equivalentes de ácido ascórbico. Para cada ensayo, se prepararon disoluciones de los extractos a una concentración de 1 mg/mL en metanol. Únicamente para el caso de FRAP la concentración de los extractos se hizo a 0.1 mg/mL en metanol.

4.6.1 Método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•)

Se utilizó la metodología descrita por Mohamad y colaboradores (2004) con modificaciones. En una placa de ELISA de 96 pozos se adicionaron 100 μL de una solución de DPPH 0.208 mM con 100 μL de cada extracto de muérdago por triplicado. Se dejó reposar la placa con la mezcla de reacción por 20 min en la oscuridad y transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia de los pozos a una

longitud de onda de 515 nm. Se realizó una curva de calibración con estándares de Trolox.

4.6.2 Ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}

Se utilizó el método descrito por Thaipong y colaboradores (2006) con modificaciones. Para la producción del radical ABTS^{•+}, se mezclaron volúmenes equivalentes de una disolución acuosa de ABTS 7 mM y una disolución de K₂S₂O₈ 2.45 mM; se dejaron reposar en la oscuridad por 18 h a temperatura ambiente. En una placa de ELISA de 96 pozos se adicionaron 180 µL de la solución del radical ABTS^{•+} y 20 µL de cada extracto de muérdago por triplicado. Posteriormente la reacción se dejó reposar en la oscuridad por 8 min y transcurrido este tiempo se realizó una lectura de la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm. Se realizó una curva de calibración con estándares de Trolox.

4.6.3 Poder Antioxidante de Reducción Ferrica (FRAP)

Se utilizó el método descrito por Pérez-Jiménez y colaboradores (2008) con modificaciones. Se preparó una disolución con TPTZ 10 mM, FeCl₃ 20 mM y solución amortiguadora de acetatos 300 mM a pH = 3.6, de esta disolución se tomaron 180 µL y fueron añadidos a 20 µL del extracto de muérdago correspondiente por triplicado en una placa de ELISA de 96 pozos. Se dejó reposar la mezcla de reacción por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una lectura en espectrofotómetro a 593 nm. Se realizó una curva de calibración con estándares de ácido ascórbico.

4.6.4 Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β caroteno

Se utilizó la metodología descrita por Wang y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. Se preparó una emulsión de β -caroteno 1.0 mg/mL en CH_2Cl_2 , ácido linoléico, Tween 40 y H_2O desionizada. Por triplicado en tubos de ensayo se mezclaron 80 μL de cada extracto de muérdago y 2 mL de la emulsión de β -caroteno, Tween 40, ácido linoléico y agua. Se leyó la absorbancia del tiempo cero en un espectrofotómetro a 470 nm. Posteriormente, la mezcla de reacción se sometió a baño maría (50°C) por 1 h, transcurrido este tiempo se leyó nuevamente la absorbancia a 470 nm. Utilizando como blanco de lectura una emulsión de ácido linoléico, Tween 40 y H_2O desionizada. El estándar utilizado en el ensayo fue una disolución de Trolox 0.5 mg/mL.

4.7 Identificación y cuantificación de (+)-catequina por cromatografía de alta eficiencia

Todos los ensayos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia Shimadzu modelo 10AVP que posee un detector UV dual. La columna utilizada fue *Purospher® STAR. RP-18* endcapped, 5 μm . La detección del equipo se ajustó a 254 y 278 nm.

4.7.1 Identificación de la presencia de (+)-catequina

Para la identificación de la (+)-catequina en los extractos metanólicos de *Struthanthus quercicola*, *Cladocolea loniceroides* y *Psittacanthus calyculatus*, se prepararon disoluciones de 40 mg/mL de los extractos y 200 $\mu\text{g/mL}$ de los siguientes estándares: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-galato de epicatequina y (-)-galato de epigalocatequina. La fase móvil utilizada fue una mezcla ternaria de H_2O -MeOH- H_3PO_4 en una proporción de 946.5:50:3.5. El flujo de la fase móvil fue

de 0.8 mg/mL, el volumen de inyección fue 10 μ L y la temperatura de la columna se fijó a 25°C.

4.7.2 Cuantificación de (+)-catequina

Se prepararon disoluciones de la fracción F_{P2A} de *Struthanthus quercicola* con una concentración de 40 mg/mL. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las utilizadas en la identificación de la presencia del compuesto. De igual forma se preparó una curva de calibración del estándar de (+)-catequina con seis concentraciones distintas (10, 50, 100, 500, 750 y 1000 μ g/mL). Este procedimiento se realizó por triplicado.

5. Resultados y Discusión

5.1 Aislamiento de la (+)-catequina a partir de las hojas del muérdago

La selección del muérdago se realizó con base en el amplio uso de esta especie en la medicina tradicional (criterio etnomédico), y en específico por su uso en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares como hipertensión, como antiséptico tópico, para la alopecia y para la diabetes mellitus (Bah *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta esto, se decidió entonces realizar un estudio fitoquímico del muérdago centrándose principalmente en las especies *Struthanthus quercicola*, *Psittacanthus calyculatus* y *Cladocolea loniceroides* el cual se enfocó en determinar la capacidad antioxidante de los extractos de las hojas en todos los casos y la cuantificación de la (+)-catequina aislada como compuesto mayoritario.

El proceso de maceración con MeOH permitió obtener un extracto total de naturaleza viscosa de color verde oscuro (20.33 g). Este extracto fue sometido a un fraccionamiento primario con particiones sucesivas con hexano y posteriormente, la fracción acuosa resultante (F_{P1H}) se particionó con AcOEt obteniéndose así dos fracciones primarias (Diagrama 1).

La fracción F_{P2A} fue sometida a un fraccionamiento secundario por métodos cromatográficos utilizando mezclas de AcOEt-MeOH en gradiente de polaridad creciente. Este proceso nos permitió obtener seis fracciones secundarias.

Finalmente, la fracción F_{MII} fue sometida a un fraccionamiento terciario con cromatografía en Sephadex LH-20 y MeOH como fase móvil. Así, fue posible aislar a partir de la fracción F_{MII-1} el compuesto S_{Q-C001} .

El compuesto S_{Q-C001} se caracterizó mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas como la (+)-catequina. Las constantes se

Resultados y Discusión

compararon con las reportadas en la literatura para el compuesto (Davies *et al.*, 1996). La confirmación de la identidad de la (+)-catequina se realizó comparando su tiempo de retención en Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con el de un estándar de (+)-catequina (Sigma Aldrich). En la Figura 11, se ilustra el espectro de RMN obtenido de la (+)-catequina aislada.

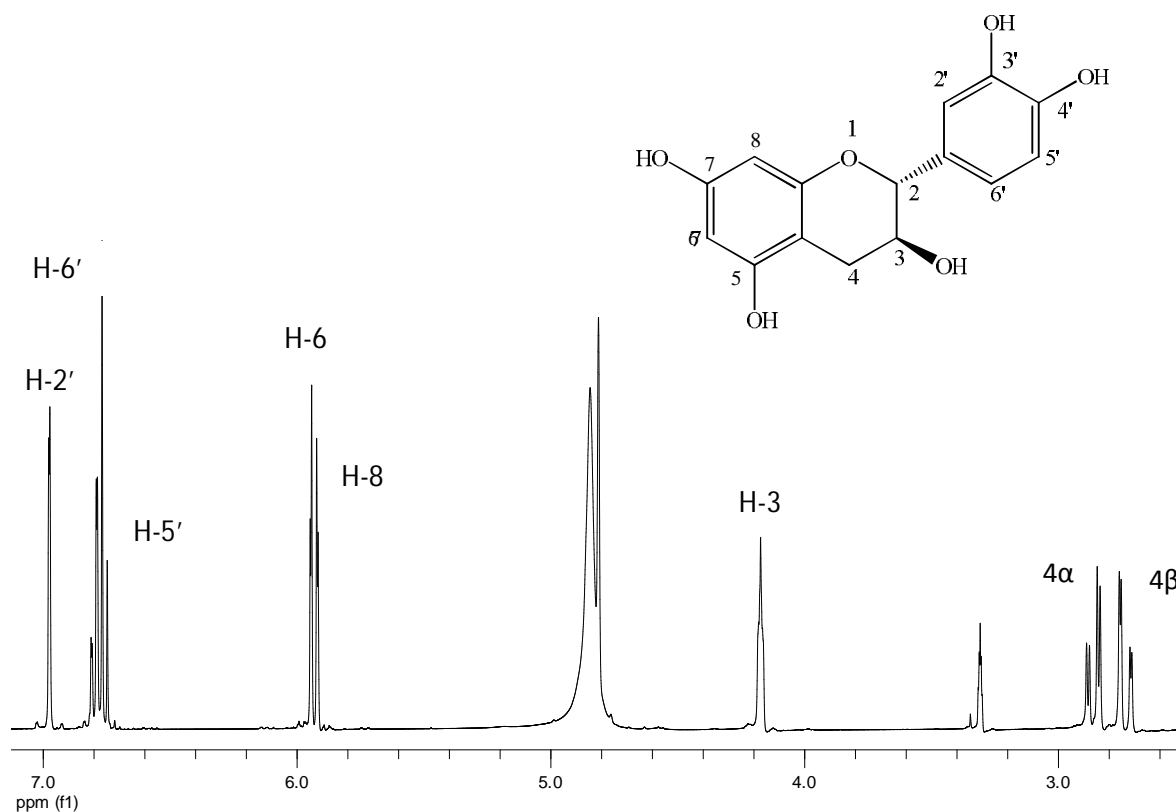


Figura 11. RMN¹H de la (+)-catequina

5.2 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para cuantificar el contenido total de fenoles en las muestras, se elaboró una curva de estándares de Trolox® (Figura 12) donde se interpolaron las absorbancias obtenidas para cada muestra. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 6.

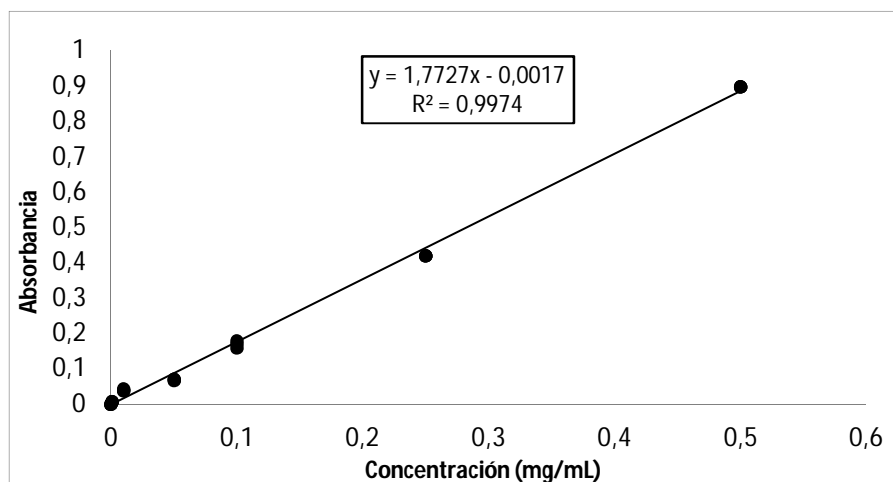


Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico para el ensayo de fenoles totales

Tabla 6. Resultados del ensayo de cuantificación de fenoles totales

Muestra	Concentración equivalente de ácido gálico (mg/mL)
Extracto metanólico <i>Psittacanthus calyculatus</i> (Pc _M)	0.342 ± 0.007
Extracto metanólico de <i>Cladocolea loniceroides</i> (Cl _M)	0.277 ± 0.001
Extracto metanólico de tallos de <i>Struthanthus quercicola</i>	0.544 ± 0.042
Extracto metanólico <i>Struthanthus quercicola</i> (Sq _M)	0.495 ± 0.012
Fracción F _{P2A} <i>Struthanthus quercicola</i>	0.690 ± 0.030
Infusión de hojas <i>Struthanthus quercicola</i>	0.859 ± 0.117

La muestra que presentó un mayor contenido de fenoles fue la infusión de *Struthanthus quercicola*, seguido de la fracción F_{P2A}. Por otro lado, el extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* tuvo el menor contenido de fenoles de todas las muestras analizadas. De manera general se observa que en la especie *Struthanthus quercicola* hay un mayor contenido de fenoles que en las otras dos, lo que es probable que tenga relación con el hecho de que en esta especie se haya logrado aislar, identificar y cuantificar al flavonoide (+)-catequina,

5.3 Evaluación de la actividad antioxidante

5.3.1 Método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•])

Para este ensayo se elaboró una curva estándar de Trolox[®] (Figura 13), en donde las absorbancias de cada una de las muestras fueron interpoladas con el fin de obtener el TEAC (concentración equivalente de Trolox[®]). Los resultados del ensayo para las muestras se encuentran en la Tabla 7.

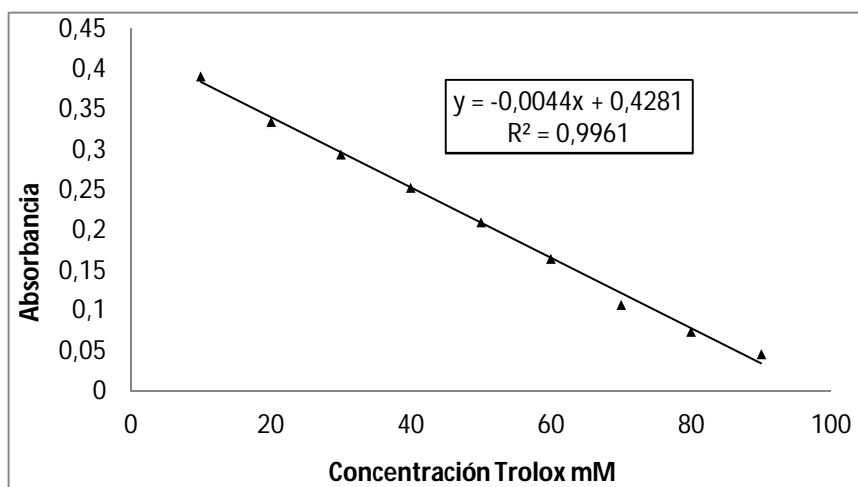


Figura 13. Curva estándar de Trolox[®] empleada para el ensayo de neutralización del radical DPPH[•]

Resultados y Discusión

Tabla 7. Resultados del ensayo de neutralización del radical DPPH•

Muestra	TEAC (mM)
Extracto metanólico <i>Psittacanthus calyculatus</i>	81.048±0.305
Extracto metanólico de <i>Cladocolea loniceroides</i> (<i>Cl_M</i>)	76.098±0.000
Extracto metanólico <i>Struthanthus quercicola</i> (<i>Sq_M</i>)	74.270±0.132
Fracción F _{P2A} <i>Struthanthus quercicola</i>	83.257±0.424
Extracto metanólico de tallos de <i>Struthanthus quercicola</i>	80.135±0.499
Infusión de hojas <i>Struthanthus quercicola</i>	81.429±0.609

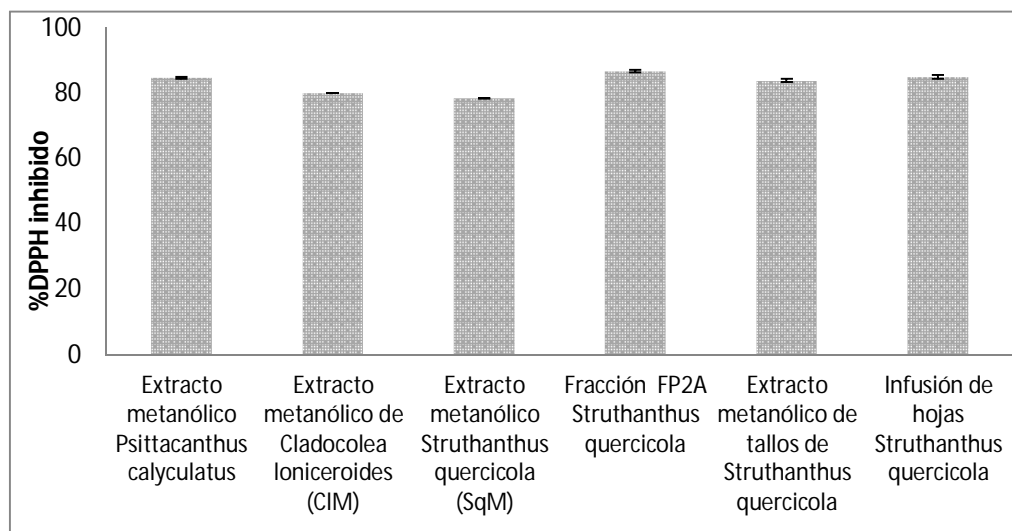


Figura 14. Actividad inhibitoria del DPPH•. Los datos se encuentran expresados como la media y el error estándar de la media.

Las muestras presentaron valores muy similares de TEAC, solo en el caso de los extractos *Sq_M* y de *Cladocolea loniceroides* se observa que su concentración equivalente de Trolox[®] son las más bajas de todas las muestras.

Todas las muestras lograron inhibir considerablemente la concentración del radical DPPH•, no existen diferencias importantes entre las muestras respecto al nivel de inhibición (Figura 14).

Este ensayo nos sugiere que de manera general las muestras del ensayo poseen la capacidad de donar hidrógenos para neutralizar al radical.

5.3.2 Ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}

En la Figura 15 se presenta la curva de calibración realizada para obtener los valores de TEAC, mismos que se encuentran agrupados en la Tabla 8.

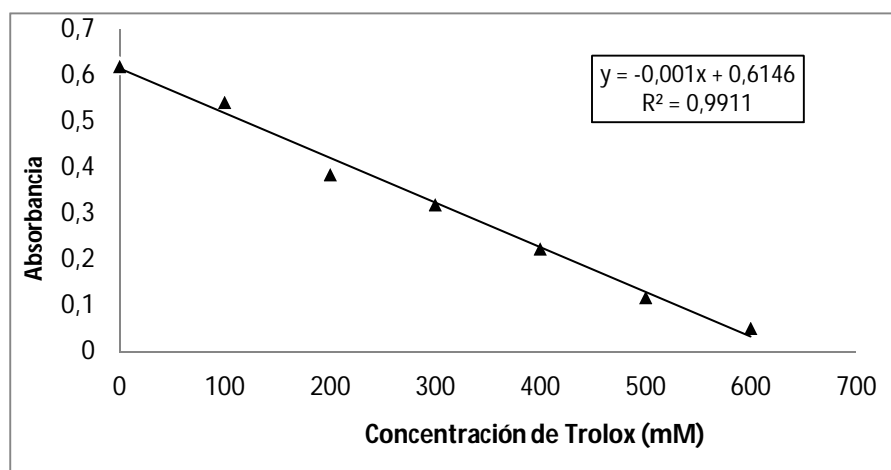


Figura 15. Curva estándar de Trolox® para el ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}

Resultados y Discusión

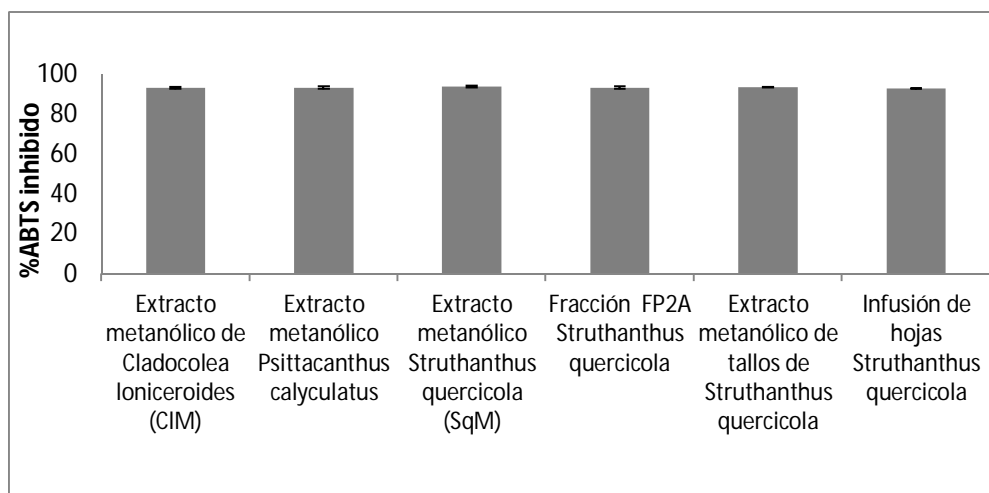


Figura 16. Actividad inhibitoria del radical catiónico ABTS^{•+}. Los datos se encuentran expresados como la media y el error estándar de la media.

Tabla 8. Resultados del ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}

Muestra	TEAC(mM)
Extracto metanólico <i>Psittacanthus calyculatus</i> (P _{CM})	584.715±2.814
Extracto metanólico de <i>Cladocolea Ioniceroides</i> (Cl _M)	585.403±4.764
Extracto metanólico <i>Struthanthus quercicola</i> (Sq _M)	589.528±3.094
Fracción F _{P2A} <i>Struthanthus quercicola</i>	585.403±5.088
Extracto metanólico de tallos <i>Struthanthus quercicola</i>	587.122±0.688
Infusión <i>Struthanthus quercicola</i>	582.653±3.828

Los valores de TEAC arrojan que todas las muestras tienen la capacidad de inhibir al radical catiónico ABTS^{•+} (Tabla 8). No existen diferencias apreciables en la capacidad para estabilizar el radical entre muestras de las tres especies, ni entre las muestras de *Struthanthus quercicola* (Fig. 16), esto puede sugerir que de

manera general que compuestos presentes en el muérdago tienen un buen potencial de fungir como fuente de hidrógenos para estabilizar radicales.

De igual manera, al no haber variaciones en el TEAC, el nivel de inhibición de $ABTS^{\bullet+}$ es casi igual para todas las muestras. Esto se puede observar a partir de la Figura 16.

5.3.3 Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

De la realización de la curva estándar de ácido ascórbico se obtuvo la Figura 17. Las absorbancias de las muestras fueron interpoladas para así obtener la capacidad de la muestra para reducir al ión férrico (Fe^{3+}). En la Tabla 9 están los resultados agrupados.

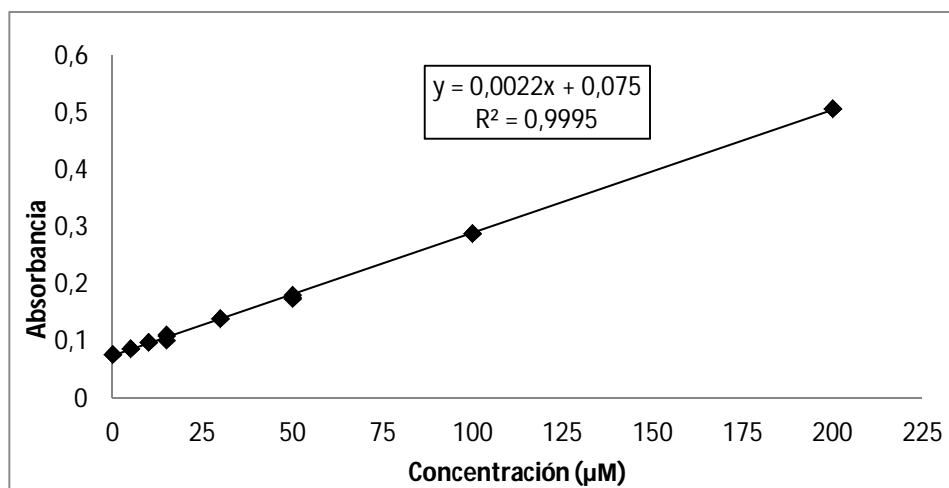


Figura 17. Curva estándar de ácido ascórbico para el ensayo FRAP

Tabla 9. Resultados del ensayo Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

Muestra	Concentración equivalente de ácido ascórbico (mM)
Extracto metanólico <i>Psittacanthus calyculatus</i> (P_{CM})	136.364 ± 8.436
Extracto metanólico de <i>Cladocolea loniceroides</i> (Cl_M)	54.697 ± 5.716
Extracto metanólico <i>Struthanthus quercicola</i> (Sq_M)	184.091 ± 3.027

Resultados y Discusión

Fracción F_{P2A} <i>Struthanthus quercicola</i> .	546.818±14.367
Extracto metanólico de tallos de <i>Struthanthus quercicola</i>	619.091±20.228
Infusión de hojas <i>Struthanthus</i> <i>quercicola</i>	193.182±2.957

En este ensayo se obtuvieron diferencias significativas entre muestras. Así, observamos que las muestras fracción F_{P2A} y el extracto de tallos de *Struthanthus quercicola*, presentan el mayor potencial reductor de todas las muestras (de más del doble). *Psittacanthus calyculatus* (Pc_M) tuvo una mayor actividad reductora que *Cladocolea loniceroides* (Cl_M), pero para ambas especies ésta resultó muy inferior que la fracción F_{P2A} o que el extracto metanólico de tallos de *Struthanthus quercicola*.

El extracto metanólico de *Struthanthus quercicola* (Sq_M) y la infusión de *Struthanthus quercicola* tienen capacidad reductora pero en menor medida que el extracto de tallos y que la fracción F_{P2A} de *Struthanthus quercicola*; sin embargo, su actividad fue mayor que la presentada por los extractos de las otras dos especies de muérdago estudiadas.

El hecho de que todas las muestras hayan presentado actividad en este ensayo, nos sugiere que actúan ante el Fe^{3+} bajo el mismo mecanismo de donar electrones para reducirlo, aunque algunas especies son más efectivas que otras en realizar este proceso.

Dentro de la misma especie *Struthanthus quercicola*, las diferencias observadas nos enseñan acerca de la variabilidad entre las distintas partes de la planta; ya que los extractos obtenidos de una parte del material vegetal (sean hojas, tallos, flores o frutos), pueden tener una composición muy diversa y por ende una actividad diferente.

5.3.4 Ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

Los valores de absorbancia registrados para cada muestra al tiempo cero y tras 1 h, se compararon con la absorbancia registrada para el control de Trolox[®] a las mismas condiciones. De esta comparación se obtuvieron porcentajes de la actividad inhibitoria que se agrupan en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

Muestra	% Actividad Inhibitoria
Extracto metanólico <i>Psittacanthus calyculatus</i> (P _{CM})	24.731±1.242
Extracto metanólico de <i>Cladocolea loniceroides</i> (Cl _M)	54.301±1.862
Extracto metanólico <i>Struthanthus quercicola</i> (Sq _M)	57.885±10.093
Fracción F _{P2A} <i>Struthanthus quercicola</i>	56.452±4.199
Extracto metanólico de tallos de <i>Struthanthus quercicola</i>	54.839±5.922
Infusión de hojas <i>Struthanthus quercicola</i>	66.487±3.703

Este ensayo tiene como fin medir la capacidad de la muestra para inhibir la peroxidación de lípidos. En el caso de las especies de muérdago observamos que la mejor inhibición se llevó a cabo por la infusión de hojas de *Struthanthus quercicola* y la más pobre la tuvo el extracto metanólico de *Psittacanthus calyculatus*. En promedio la inhibición fue de 52%; sin embargo, a pesar de estos resultados, no hay diferencias importantes entre los resultados obtenidos de inhibición entre los extractos, pero es claro que las muestras son capaces de llevar a cabo la inhibición de la peroxidación lipídica.

5.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

5.4.1 Identificación de la presencia de catequinas

Se eligió un método de cromatografía de líquidos, para llevar a cabo el análisis del contenido de catequinas en las especies de muérdago estudiadas en el presente trabajo. Se llevó a cabo la inyección de las muestras metanólicas *Struthanthus quercicola* (fracción F_{P2A}), *Psittacanthus calyculatus* (P_{CM}) y *Cladocolea loniceroides* (Cl_M) en el cromatógrafo de líquidos con el fin de obtener los perfiles cromatográficos de cada especie. Posteriormente se inyectaron estándares de (+)-catequina (Sigma Aldrich), (-)-epicatequina, (-)-galato de epicatequina y (-)-galato de epigalocatequina. De esta manera, a través de los tiempos de retención obtenidos y los perfiles cromatográficos de las muestras (Fig. 19 a Fig. 25), se pudo conocer si las especies de muérdago contenían alguna de las catequinas; esto después nos permitió cuantificar la catequina identificada en el extracto y en el material vegetal realizando una curva estándar de (+)-catequina.

Resultados y Discusión

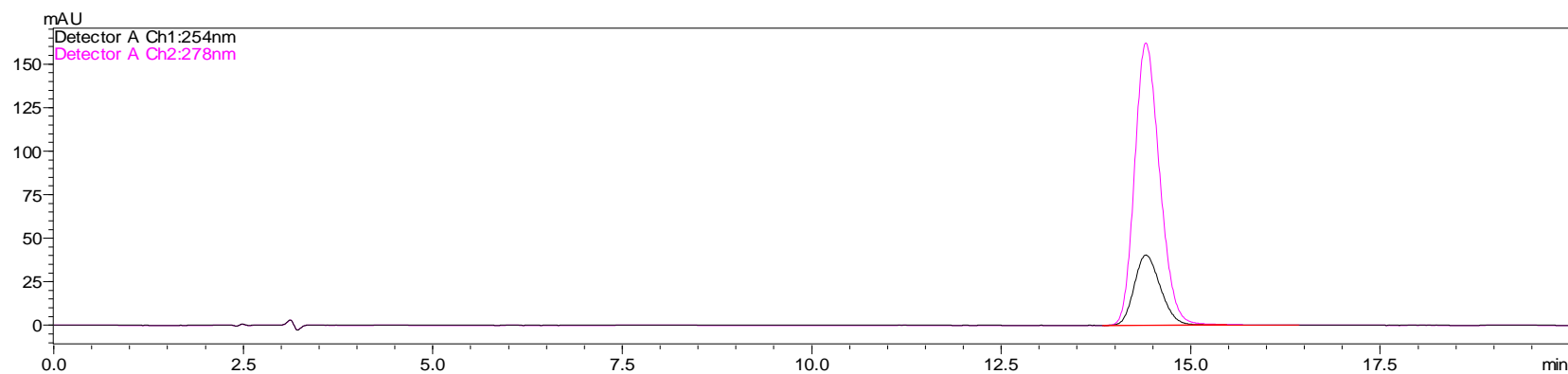


Figura 19. Cromatograma del estándar de (+)-catequina (Sigma Aldrich) (200 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 14.405 min.

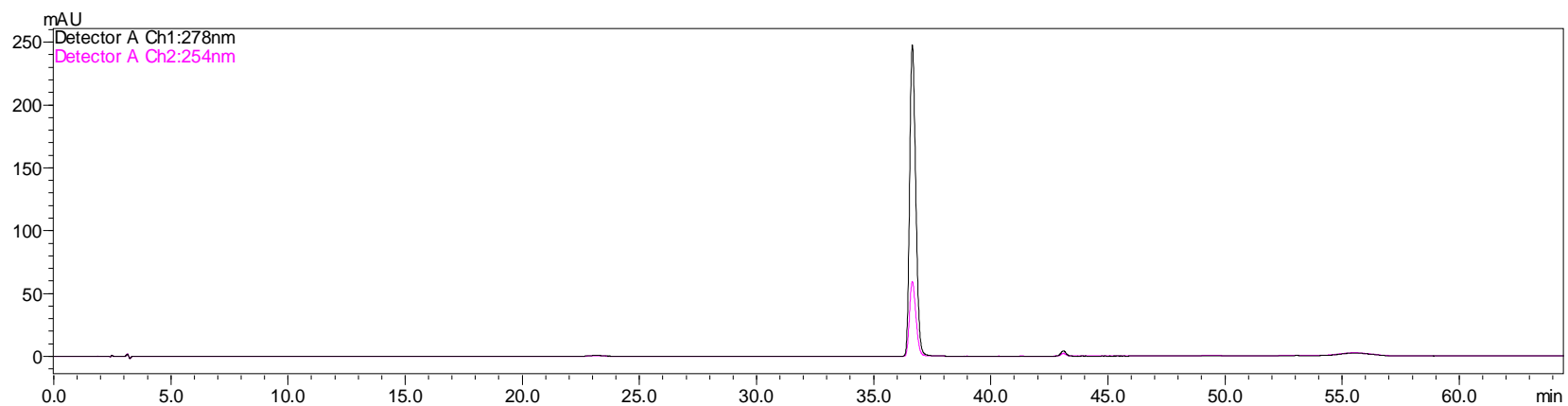


Figura 20. Cromatograma del estándar de (-)-epicatequina (200 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 36.647 min

Resultados y Discusión

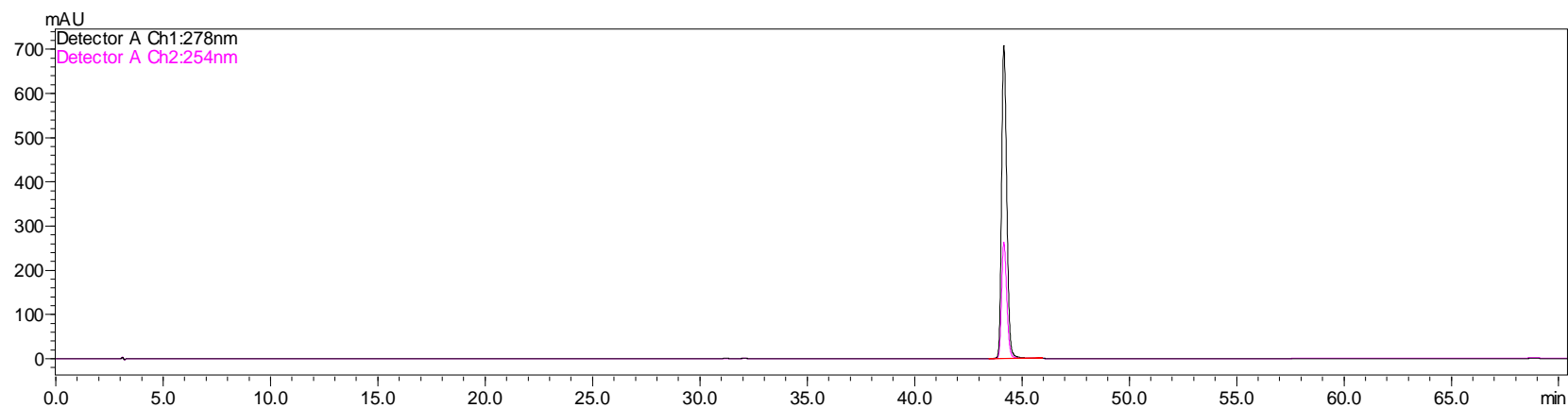


Figura 21. Cromatograma del estándar de (-)-galato de epicatequina (200 µg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 44.154 min.

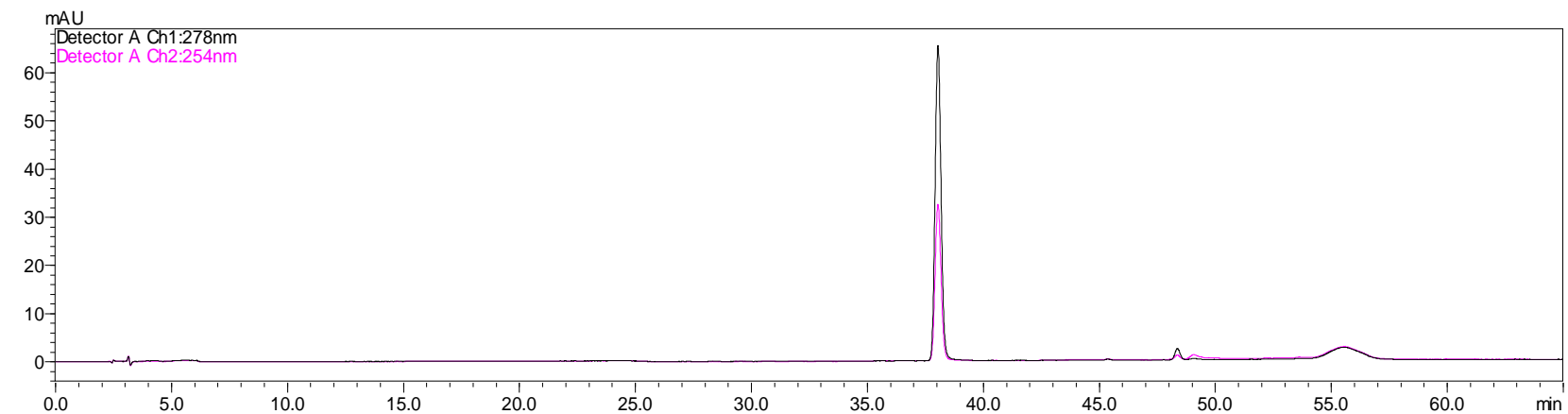


Figura 22. Cromatograma del estándar de (-)-galato de epigallocatequina (200 µg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención = 38.035 min.

Resultados y Discusión

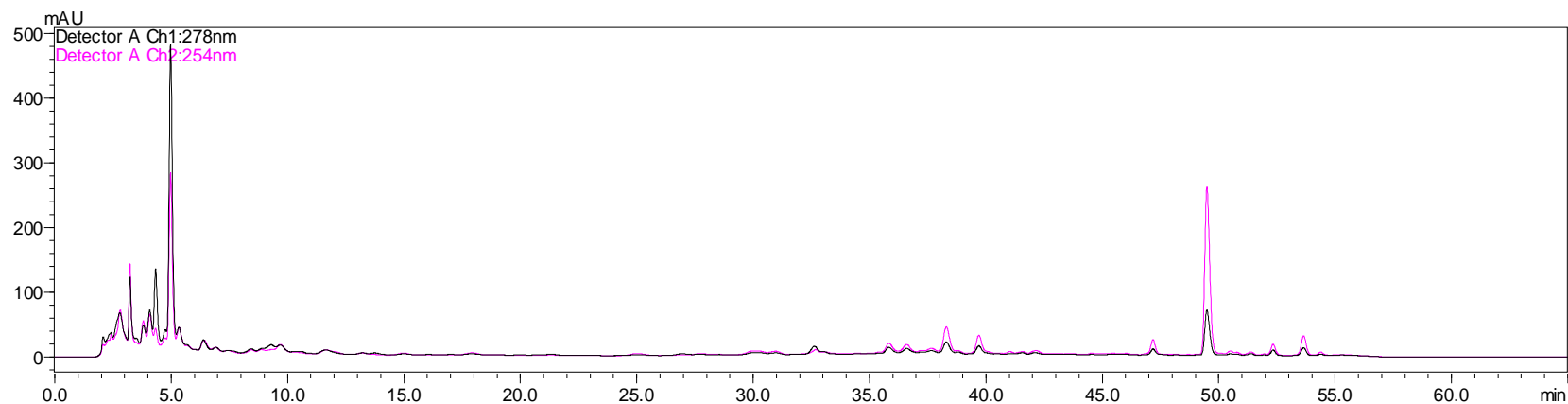


Figura 23. Cromatograma del extracto metanólico de *Psittacanthus calyculatus* (P_{CM}) (40 mg/mL) en condiciones normales de operación ($\lambda = 278$ nm y $\lambda = 254$ nm; temperatura de columna: 25°C; velocidad de flujo = 0.8 mL/min; fase móvil $H_2O:MeOH:H_3PO_4$ (946.5:50:3.5) y volumen de inyección = 10 μ L).

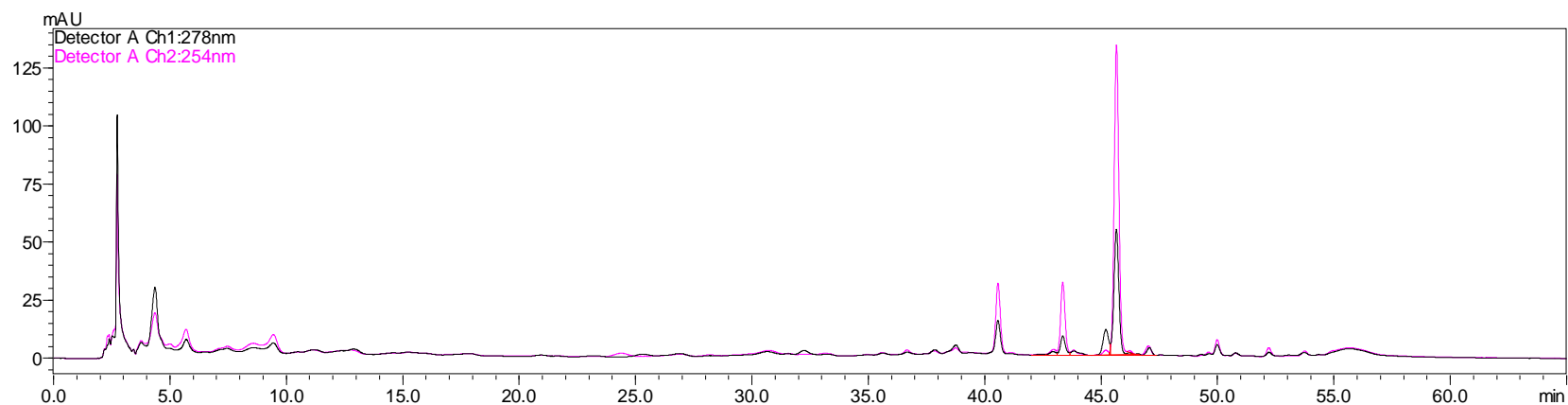


Figura 24. Cromatograma del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* (Cl_M) (40mg/mL) en condiciones normales de operación.

Resultados y Discusión

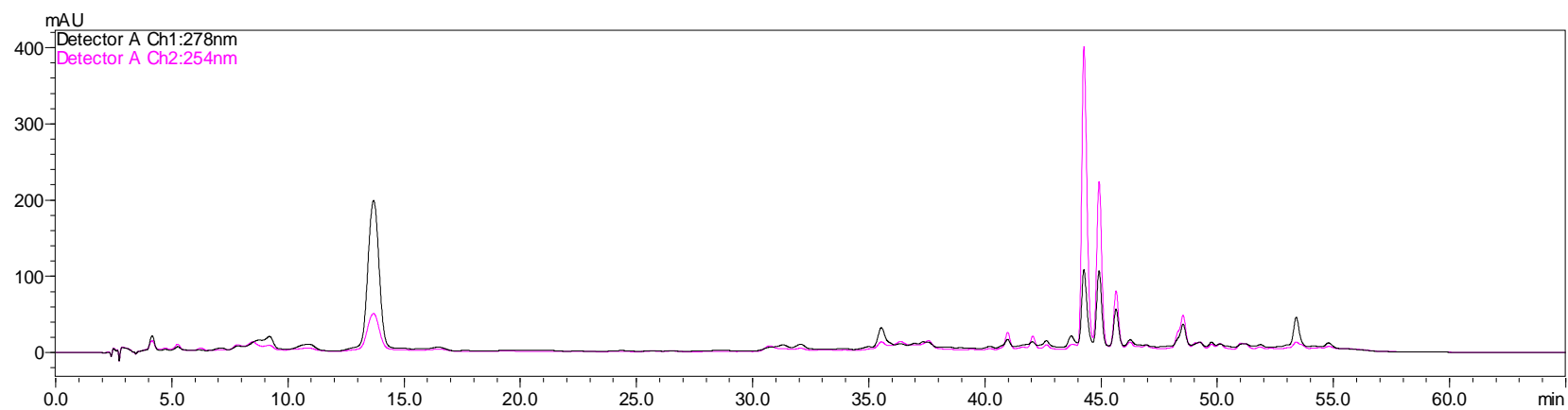


Figura 25. Cromatograma de la fracción F_{P2A} de *Struthanthus quercicola* (40 mg/mL) en condiciones normales de operación. Tiempo de retención del pico de identificación de (+)-catequina = 13.681 min.

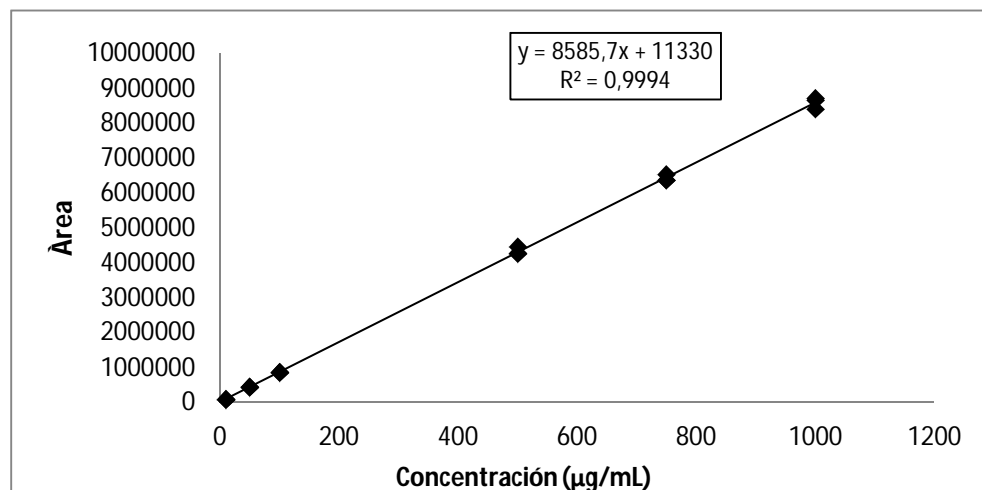
Resultados y Discusión de Resultados

Al realizar la comparación entre los perfiles cromatográficos que se obtuvieron de las muestras y con los tiempos de retención (T_R) obtenidos de los estándares, se observa que la fracción F_{P2A} de *Struthanthus quercicola* es la única muestra donde se identificó una de las catequinas (Fig. 19 y Fig. 25). La catequina identificada fue la (+)-catequina; esto era algo esperado, dado que como se mencionó anteriormente, a partir de esta fracción se llevó a cabo el aislamiento del compuesto. El tiempo de retención del estándar fue de 14.405 min (Fig. 19) y para el pico identificado como (+)-catequina fue de 13.681 min en la fracción F_{P2A} (Fig. 25); por lo cual, aunque los tiempos de retención no son idénticos, la identificación se considera como válida ya que se acepta una variación en los T_R del 10% según el método.

5.4.2 Cuantificación de (+)-catequina en los extractos

Una vez que se identificó la (+)-catequina en la fracción F_{P2A} de *Struthanthus quercicola*, se inyectaron estándares de este compuesto a distintas concentraciones, se obtuvieron las áreas para cada concentración y se trazó una curva de calibración (Fig. 26). Posteriormente, se interpolaron los valores de las áreas obtenidas en la fracción para el pico del compuesto; de esta forma se pudo cuantificar el contenido de (+)-catequina primero en la fracción y después en el peso seco del material vegetal.

Figura 26. Curva de calibración de (+)-catequina.



Resultados y Discusión de Resultados

El contenido promedio de (+)-catequina en la especie *Struthanthus quercicola* fue de 167.3 ± 2.8 mg/Kg de peso seco. Un estudio realizado en 2011 por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), reporta el contenido de flavonoides, entre ellos catequina, de varias frutas de consumo común. Se observan altos contenidos de catequina en frutas como: las zarzamoras (*Vaccinium spp.*) 371 ± 247.1 mg/Kg; la uva negra 101.4 ± 29.1 mg/Kg; chabacano (*Prunus armeniaca*) 36.7 ± 4.6 mg/Kg; plátanos (*Musa acuminata Colla*) 61.0 ± 5.3 mg/Kg; arándanos crudos (*Viburnun opulus*) 290.4 mg/Kg; vino tinto de mesa 71 ± 1.9 mg/Kg; semillas de uva 746.3 ± 57.8 mg/Kg.

En otro estudio realizado por Tsanova-Savova y colaboradores (2005) se reportó contenido de (+)-catequina en varias frutas en Bulgaria. Importantes cantidades se encontraron en: manzana 9.3 mg/Kg; durazno 12.3 mg/Kg; chabacano 73.4 mg/Kg; ciruela 33.1 mg/Kg; cereza 15.1 mg/Kg; frambuesa 13.6 mg/Kg; zarzamora 20.9 mg/Kg; fresa 31.1 mg/Kg; mora azul 16.6 mg/Kg; uva blanca 58.9 mg/Kg y el mayor contenido se encontró en la uva negra 108.3 mg/Kg. Los resultados se expresaron en el estudio como mg de (+)-catequina por Kg de peso fresco. Las frutas se analizaron con piel y semillas.

Si bien no se puede hacer una comparación directa entre el contenido de (+)-catequina encontrado en *Struthanthus quercicola* y los resultados de los trabajos citados, sí podemos señalar a partir de estos estudios, que el contenido del compuesto en esta especie de muérdago es importante.

6. Conclusiones

Todos los extractos analizados de las especies de muérdago *Psittacanthus calyculatus*, *Struthanthus quercicola* y *Cladocolea loniceroides*, así como la fracción F_{P2A}, demostraron tener fenoles en su composición. Por otro lado, presentaron actividad antioxidante e inhibitoria ante los radicales DPPH• y ABTS•⁺. De igual forma, estas muestras lograron reducir el ión Fe³⁺ en el ensayo FRAP. Finalmente tuvieron una buena actividad inhibitoria de la lipoperoxidación.

De las tres especies sólo en *Struthanthus quercicola* se logró identificar por CLAE la presencia del flavonoide (+)-catequina, misma que fue cuantificada en la fracción F_{P2A} ya que de esta misma muestra se llevó a cabo la obtención del compuesto. La presencia de una catequina en la especie *Struthanthus quercicola*, puede explicar el que haya tenido una mejor reducción del ion férrico, un mayor contenido de fenoles y mejor inhibición de la lipoperoxidación que *Cladocolea loniceroides* o *Psittacanthus calyculatus*.

7. Perspectivas

- ❖ Aislar otros compuestos de las especies de muérdago analizadas y evaluar su actividad antioxidante.
- ❖ Obtener mediante ensayos cinéticos la capacidad neutralizante relativa ante el radical usando áreas bajo la curva.
- ❖ Obtención de la Concentración Inhibitoria 50 de los compuestos que puedan obtenerse de las especies de muérdago y compararlas con los reportes de otros antioxidantes en la literatura.
- ❖ Ya que el muérdago es un parásito que amenaza la salud de los bosques, pueden analizarse otros muérdagos comunes como son: *Cladocolea diversifolia*, *Struthanthus interruptus* y *Struthanthus depeanus*, de tal forma que pueda describirse la fitoquímica de la especie, encontrar nuevos compuestos y evaluar su actividad antioxidante.
- ❖ Realizar estudios *in vivo* de la (+)-catequina y compuestos que puedan obtenerse posteriormente para evaluar si tienen actividad importante en modelos de estrés oxidante (especialmente de ECV).

8. Referencias

- Alexandre et al., 2012. Encyclopedia of Cancer, pp. 2730-2733.
- Alvarado, D. & Saavedra, L., 2005. El Género Cladocolea (Loranthaceae) en México: Muérdago Verdadero o Injerto. *Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 11(001), pp. 5-9.
- AMA, 2009. Informe de actividades de la AMA 2008. *Árbol Asociación Mexicana de Arboricultura*, Issue 2, pp. 1-32.
- Amabeoku, G., Leng, M. & Syce, J., 1998. Antimicrobial and anticonvulsant activities of *Viscum capense*. *Journal of Ethnopharmacology*, Issue 61, pp. 237-241.
- Aruoma, O., 1994. Nutrition and Health aspects of Free Radicals and Antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), pp. 671-683.
- Bah, M. et al., 2011. Chemical Constituents of the Mexican Mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*). *Molecules*, Issue 16, pp. 9397-9403.
- Bendich, A., 1990. *Antioxidant Micro Nutrients and Immune Responses*. Nueva York: New York Academy of Science .
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. & Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65(18/19), pp. 1865-1874.
- Bors, W. & Michel, C., 1999. Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: Pulse radiolysis studies. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11/12), pp. 1413-1426.
- Buonocore et al., 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), pp. 186-190.
- Burr, M., 1995. Explaining the French paradox. *J R Soc Health*, Volume 115, pp. 217-219.

- Carr, A., McCall, M. & Frei, B., 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(7), pp. 1716-1723.
- Cházaro, B. et al., 1991. Conociendo a los muérdagos. Taller sobre detección, evaluación y manejo de muérdagos en coníferas. *Notas técnicas.SARH.SFF*.
- Cházaro, M., 1987. Loranthaceae (Muérdagos) del centro y sur del Estado de Veracruz. *IV Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal y IV reunión sobre Plagas y Enfermedades Forestales*, pp. 604-612.
- Cisneros, E., 1995. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* , 14(1).
- Cochrane, C. G., 1991. Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine*, 91(3), pp. S23-S30.
- Cook, N. & Samman, S., 1996. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), pp. 66-76.
- Costea, M., s.f. *Host tree being parasitized by the mistletoe*. [Online] disponible en: <http://www.parasiticplants.siu.edu/Loranthaceae/images/PsittacanthusCalyculatus13s.jpg> [Accessed 10 Febrero 2013].
- Cui, K., Luo, X., Xu, K. & Murthy, M., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28 (2004) 771– 799, Volume 28, pp. 771-799.
- Davies, L., Cai Ya, Davies, A. / Lewis, J., 1996. ^1H and ^{13}C Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magenetic Resonance in Chemistry* (34) pp. 887-890.

- Don, G., 1934. A General System of Gardening and Botany. In: Londres: Gilbert and Rivington, p. 414.
- Dorado Martínez, C., Rivas, S. & Rugerio, C., 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(6), pp. 229-235.
- Fernández, T. et al., 1998. Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Issue 62, pp. 25-34.
- Fukumoto, L. & Mazza, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), pp. 3597-36048.
- Fukunaga, T. et al., 1989. Studies on the constituents of Japanese mistletoes from different host trees, and their antimicrobial and hypotensive properties. *Chemical Pharmacology Bulletin (Tokio)*, Issue 37, pp. 1543-1546.
- Gehlhar, M. & Coyle, W., 2001. Global Food Consumption and Impacts on Trade Patterns. In: A. Regmi, ed. *Changing Structure of Global Food Consumption and Trade*. s.l.:Economic Research Service/USDA, pp. 1-10.
- Graziano, M., Widmer, G. & Coussio, J., 1967. Flavonoids from the Argentine mistletoe, *Psittacanthus cuneifolius*. *Phytochemistry*, Issue 6, pp. 1709-1711.
- Groot, H. & Rauen, U., 1998. Tissue Injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids.. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, Volume 3, pp. 249-55.
- Gutiérrez, J., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), pp. 126-133.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3a ed. s.l.:Oxford University Press.

- Heim, K. M., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Volumen 13, pp. 572-584.
- Herrera, F., 2005. Principales Loranthaceas que afectan las plantaciones de naranjas en Costa Rica. *Revista de Agricultura Tropical*, Volume 35, pp. 27-38.
- Hostanska, K. et al., 1995. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Natural Immunity*, Issue 14, pp. 295-304.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L., 2005. Journal of Agricultural and Food Chemistry. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*, Volumen 53, pp. 1841-1856.
- Jordan, E. & Wagner, H., 1986. Structures and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology*, Issue 42, pp. 8-15.
- Levine, M. et al., 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA*, 281(15), pp. 1415-1423.
- Liochev, S. I. & Fridovich, I., 1994. The role of O₂ in the production of HO: In vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 16, pp. 29-33.
- Liu, Z. y otros, 2000. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein.. *Chemistry and Physics of Lipids*, Volumen 106, pp. 53-63.
- Lokman, A. & Emir, M., 2011. Chapter twelve- Key Roles of Vitamins A,C, and E in Aflatoxin B₁- Induced Oxidative Stress. *Vitamins & Hormones*, Volume 86, pp. 287-305.
- Lotito, S. & Frei, B., 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or

- epiphenomenon?. *Free Radical Biology & Medicine*, Issue 41, pp. 1727-1746.
- Mohamada, H. et al., 2004. DPPH Free Radical Scavenger Components from the Fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Z Naturforsch*, Volume 59c, pp. 811-5.
 - Moon, J.-K. & Shibamoto, T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, Volumen 57, pp. 1655-1666.
 - Morel, I. y otros, 1993. Antioxidant and iron chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*, 45(1), pp. 13-19.
 - Norton, D. & Carpenter, M., 1998. Mistletoes as parasites: Host specificity and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(3), pp. 101-105.
 - Park, J., Hyun, C. & Shin, H., 1998. Cytotoxicity of heart-treated Korean mistletoe. *Cancer Letters*, Issue 126, pp. 43-48.
 - Park, J., Hyun, C. & Shin, H., 1999. Cytotoxic effects of the components in heart-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters*, Issue 139, pp. 207-213.
 - Pekmezci, D., 2011. Vitamin E and Immunity. *Vitamins and Hormones*, 86(8), pp. 179-215.
 - Pérez M.D. (2004) Plantas antidiabéticas utilizadas en México: validación del efecto hipoglucemiante de *Struthanthus* sp. Tesis de Licenciatura (Biólogo) Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 64 p
 - Pérez, C., Ceja, J. & Vela, G., 2006. Árboles y muérdagos: una relación que mata. *ContactoS (UAM-I)*, Issue 59, pp. 28-34.
 - Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980. In: *Plantas de la Flora Argentina Empleadas en Medicina Popular*. Buenos Aires : Hemisferio Sur, p. 823.
 - Rodríguez, M. E. et al., 2003. Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the

- vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*, Issue 86, pp. 213-218.
- Rodríguez, M. E. *et al.*, 2003. Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 86, pp. 213-218.
 - Saavedra, L. *et al.*, 2005. Anatomía patológica del muérdago verdadero *Cladocolea Ioniceroides* Van Tieghem parásito del ahuejote (*Salix bonplandiana*).. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 11(001), pp. 5-9.
 - Sajner, J. & Veris, O., 1958. Ocurrence of histamin in *Viscum album*. *Pharmazie*, Issue 13, p. 170.
 - Scott, B., Butler, J., Halliwell, B. & Aruoma, O., 1993. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radical Research Communications*, 19(4), pp. 241-253.
 - Serrano, M. *et al.*, 2011. Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea Ioniceroides* (van Tieghem) Kujit Loranthaceae. *Revista mexicana de ingeniería química*, Número 2.
 - Serrato-Barajas, B. E., 1997. *Efecto del extracto de Psittacanthus macrantherus Eichl sobre la presión arterial, frecuencia cardiaca y tejido intestinal aislado de rata*. México: Universidad de San Nicolas de Hidalgo .
 - Shahidi, F. & Alexander, M., 1998. Green tea catechins as inhibitors of oxidation of meat lipids. *Journal of Food Lipids*, 5(2), pp. 125-133.
 - Singleton, V. & Rossi, J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 16, pp. 144-158.
 - Sinha, A. *et al.*, 1999. Glycoside primers of *Psittacanthus cucullaris*. *Journal of Natural Products*, Issue 62, pp. 1036-1038.

- SMA, 2007. *Secretaría del Medio Ambiente*. [Online] Available at: <http://www.sma.df.gob.mx/drupc/index.php?opcion=15> [Accessed 02 01 2013].
- Sorg, O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes Rendus Biologies*, 327(7), pp. 649-662.
- Sudheesh, S., Sandhya, C., Sarah, K. & Vijayalakshmi, N., 1999. Antioxidant activity of flavonoids from solanum melongena. *Phytotherapy Research*, 13(5), pp. 393-396.
- Taira, C. et al., 1994. Estudio farmacológico de un agente vasoactivo presente en *Ligaria cuneifolia* var. *cuneifolia*.. *Acta Farmacéutica Bonarense*, Issue 13, pp. 91-95.
- Tarrant, D., 2007. *Botany Photo of the Day - Psittacanthus calyculatus*. [En línea]. Disponible en: http://www.botanicalgarden.ubc.ca/potd/2007/08/psittacanthus_sp.php#002227 [Accessed 10 Febrero 2013].
- Tsanova-Savova, S., Ribarova, F. & Gerova, M., 2005. (+)-Catequina and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(7), pp. 691-698.
- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M. & Niki, E., 1995. Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation.. *Archive of Biochemistry Biophysics*, Volume 323, pp. 137-147.
- UNAM, 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Injerto&id=7848>. [Último acceso: 24 07 2013].
- U.S. Department of Agriculture, A. R. S., 2011. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0*. [En línea] Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/> [Último acceso: 31 05 2013].

- Valko et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 39, pp. 44-84.
- Vázquez Collazo, I. y B. W. Geils, 2002. Psittacanthus in Mexico. Cap 2 en: B. W. Geils, J. Cibrián Tovar y B. Moody (eds.), Mistletoes of North American conifers. General Technical Reports RMRS-GTR-98. US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Ogden, Utah. 123 p.
- Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Venereo, J., 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*, 31(2), pp. 126-133.
- Winterferld, K. & Dorle, E., 1942. The active material of mistletoe (*Viscum album* L.) II. *Archives of Pharmacy*, pp. 23-23.
- Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y. & Shimamura, T., 2003. A combination effecto of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro.. *Current Microbiology*, Issue 47, pp. 244-249.
- Yataro, O., Journal of Agronomy. The components of *Viscum album*. *Searching for nitrogenous compound; isolations of arginin*, Issue 17, pp. 219-221.
- Yilmaz, Y., 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, Volumen 17, pp. 64-71.
- Zee Cheng, R., 1997. Anticancer research on Lorantaceae plants. *Drugs of the Future*, Issue 22, pp. 519-530.