



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE LA ESPECIE DE MUÉRDAGO
Cladocolea loniceroides”**

T E S I S

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

**P R E S E N T A
JANET TAPIA HERNÁNDEZ**



México, D. F.

2014



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:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
VOCAL:	Dr. Arturo Navarro Ocaña
SECRETARIO:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. SUPLENTE:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. SUPLENTE:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 111 del Conjunto E, Departamento de Farmacia de la
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Janet Tapia Hernández



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.....	I
LISTA DE DIAGRAMAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.4. MUÉRDAGO VERDADERO.....	4
2.4.1. Definición de muérdago.....	4
2.4.2. Nombres comunes del muérdago.....	4
2.4.3. Aspectos históricos	4
2.4.4. Tipos de muérdago.....	6
2.4.5. Descripción botánica del muérdago.....	7
2.4.5.1. Características físicas	7
2.4.5.2. Ciclo biológico.....	7
2.4.5.2.1. Aves que intervienen en la diseminación	8
2.4.5.3. Hemiparasitismo.....	8
2.4.5.4. Daño forestal	9
2.4.5.5. Control del muérdago.....	9
2.4.6. Especies arbóreas infectadas por muérdago	10
2.4.7. Distribución geográfica del muérdago	11
2.4.7.1. El muérdago en el mundo.....	11
2.4.7.2. El muérdago en la República Mexicana	12
2.4.7.3. El muérdago en la Ciudad de México.....	12
2.4.8. Composición química	17
2.4.8.1. Compuestos fenólicos.....	18
2.4.8.2. Flavonoides	18
2.4.9. Usos y propiedades medicinales	23
2.4.9.1. Usos no farmacológicos del muérdago.....	23
2.4.9.2. El muérdago y la Medicina.....	23
2.4.9.3. Manifestaciones clínicas	23
2.4.9.3.1. Toxicidad.....	23
2.4.9.3.2. En caso de abuso de ingestión.....	24
2.5. ESPECIE <i>Cladocolea loniceroides</i>	25
2.5.1. Nombres comunes	25
2.5.2. Clasificación taxonómica de <i>Cladocolea loniceroides</i>	25
2.5.3. Descripción botánica.....	25



2.5.3.1. Descripción macroscópica de <i>Cladocolea loniceroides</i>	25
2.5.4. Hospedantes del género <i>Cladocolea</i>	26
2.5.5. Distribución geográfica de <i>Cladocolea loniceroides</i>	26
2.5.6. Época de recolecta	28
2.5.7. Usos de <i>Cladocolea loniceroides</i>	28
2.5.7.1. Etnobotánica	28
2.5.7.1.1. Formas de dosificación a nivel popular	28
2.5.8. Efectos secundarios y precauciones	28
2.5.9. Toxicidad de <i>Cladocolea loniceroides</i>	30
2.6. ANTIOXIDANTES	30
2.6.1. Clasificación de los antioxidantes	31
2.6.1.1. Actividad antioxidante de los flavonoides	32
2.6.1.2. Actividad antioxidante de las catequinas	32
2.6.2. Determinación de la actividad antioxidante	34
2.6.2.1. Medición de la actividad antioxidante	34
2.6.2.2. Ensayo DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	36
2.6.2.3. Ensayo ABTS ^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)	38
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. OBJETIVOS	42
4.1. GENERAL	42
4.2. ESPECÍFICOS	42
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	43
5.1. MATERIAL Y EQUIPO	43
5.1.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)	43
5.1.2. Cromatografía en capa delgada de tipo preparativo (CCDP)	44
5.1.3. Cromatografía en columna abierta (CCA)	44
5.1.4. Rotaevaporador	44
5.1.5. Espectrometría de masas	44
5.1.6. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	44
5.1.7. Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS)	45
5.1.8. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	45
5.1.9. Pruebas de antioxidantes	46
5.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES	47
5.3. MATERIAL VEGETAL	48
5.4. EXTRACCIÓN	49
5.5. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE CL-1	50
5.5.1. Fraccionamiento de CL-1-IX	52



ÍNDICE



5.5.2. Identificación de la cinarina (1).....	53
5.6. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE CL-2.....	54
5.6.1. Fraccionamiento de CL-2-XXVI.....	55
5.6.2. Aislamiento de (-)-epicatequina (2).....	56
5.6.3. Aislamiento de (+)-catequina (3).....	57
5.5.4. Identificación de catequinas por HPLC.....	57
5.7. PRUEBAS DE ANTIOXIDANTES.....	58
5.7.1. Preparación de las muestras.....	58
5.7.2. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH [•]	59
5.7.2.1. Preparación de la solución de DPPH [•]	59
5.7.2.2. Capacidad captadora del radical DPPH [•]	59
5.7.2.3. Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox.....	61
5.7.3. Actividad inhibidora del catión radical ABTS ^{•+}	61
5.7.3.1. Generación de radical catión ABTS ^{•+}	61
5.7.3.2. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método del ABTS ^{•+}	62
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
6.1. AISLAMIENTO DE COMPUESTOS.....	64
6.1.1. Cinarina.....	64
6.1.2. (-)-epicatequina.....	67
6.1.1. (+)-catequina.....	72
6.2. IDENTIFICACIÓN DE CATEQUINAS POR HPLC.....	76
6.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	80
6.3.1. Ensayo DPPH.....	80
6.3.1.1. Condiciones preliminares para el ensayo DPPH.....	80
6.3.1.2. Determinación de la actividad antioxidante (AAOx) por el método del DPPH [•]	81
6.3.1.3. Determinación de la concentración media inhibitoria.....	83
6.3.2. Ensayo ABTS ^{•+}	85
6.3.2.1. Condiciones preliminares para el ensayo ABTS ^{•+}	85
6.3.2.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS ^{•+}	85
6.2. DETERMINACIÓN DE EQUIVALENTES TROLOX.....	88
7. CONCLUSIONES.....	94
8. PERSPECTIVAS.....	95
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

Representación	Significado
α	Alfa
β	Beta
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
-OH	Hidroxilo
&	Y
%	Por ciento
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
A	Absorbancia
AAOx	Actividad antioxidante
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ABTS $\bullet\bullet$	Catión radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
a.C.	Antes de Cristo
AcOEt	Acetato de etilo / etanoato de etilo
AMA	Asociación Mexicana de Arboricultura
AOx	Antioxidante
ASTM	American Society for Testing Materials
ATP	Adenosine triphosphate Adenosín-5'-trifosfato / trifosfato de adenosina
c	Cuarteto
C	Carbono
C.	<i>Cladocolea</i>
$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Fenol / ácido carbólico / ácido fénico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada de tipo preparativo
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_2Cl_2	Cloruro de metileno / dicloro metano
CH_3CN	Acetonitrilo / cianuro de metilo
cm	Centímetro



Representación	Significado
CoA	Coenzima A
CONAFOR	Comisión Nacional Forestal
d	Doble
DAD	Detector de arreglo de diodos
d.C.	Después de Cristo
dd	Doble de dobles
D. F.	Distrito Federal
DFS	Double focussing system Sistema de doble enfoque
DMSO- d_6	Dimetil sulfóxido deuterado
DPPH	1,1-Difenil-2-picril hidrazilo
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picril hidrazilo
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ed.	Edición
Eds.	Editores
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ET	Transferencia de electrones
<i>et al.</i>	Y colaboradores
etc.	Etcétera
eV	Electron volts
F ₂₅₄	Indicador fluorescente con una λ de excitación de 254 nm
g	Gramo
GPx	Glutación peroxidasa
h	Hora
H	Hidrógeno
H ₂ O	Agua
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
HCOOH / CH ₂ O ₂	Ácido fórmico
HPLC	High performance liquid chromatography Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
HSCoA	Coenzima A cuando no está unida a un grupo acilo
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration Concentración inhibitoria 50 / concentración inhibitoria máxima media
ID	Investigación y Desarrollo
IMAO	Inhibidores de la monoamino oxidasa



Representación	Significado
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
J	Constante de acoplamiento
$K_2S_2O_8$	Persulfato de potasio / peroxodisulfato de potasio
kg	Kilogramo
kV	Kilovoltio
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
LDL	Low density lipids Lípidos de baja densidad
m	Masa
m	Metro
mAU	Milliabsorbance units Unidades miliabsorbancia
MeOH	Metanol
MeOH- d_4	Metanol deuterado
mesh	Malla
MHz	Megahertz
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
N. C.	Nombre científico
N. V.	Nombre vulgar
nm	Nanómetro
[O]	Oxidación
OMS	Organización Mundial de la Salud
p. e.	Por ejemplo
p. f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
REDFORESTA	Red Social de los Profesionales del Medio Natural
R^2	Coefficiente de correlación
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13



Representación	Significado
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
SEPEAP	Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria
SOD	Superóxido dismutasa
s	Singulete
sp.	Especie
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox
TMS	Tetrametilsilano
T _R	Tiempo de retención
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
USA	United States of America Estados Unidos de América
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación
USDA	United States Department of Agriculture Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Radiación ultravioleta
V.	<i>Viscum</i>
Vis	Visible
Vol.	Volumen
vs	Versus / contra
WHO	World Health Organization Organización Mundial de la Salud
z	Carga

LISTA DE DIAGRAMAS

No. Diagrama	Contenido	No. Página
1.	Ruta biosintética de flavonoides.	21
2.	Proceso de extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de <i>Cladoclea loniceroides</i> .	51
3.	Protocolo para la preparación de la muestra.	58
4.	Método para evaluar actividad antioxidante por el método DPPH•.	60
5.	Protocolo para la generación del radical catión ABTS•+.	62
6.	Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS•+.	63



LISTA DE FIGURAS

No. Figura	Contenido	No. Página
1.	Muertes por enfermedades no contagiosas.	1
2.	Línea del tiempo de la historia de los usos del muérdago.	5
3.	Partes de muérdago: hojas, flor femenina y semillas.	7
4.	Principales aves responsables de la propagación del muérdago.	8
5.	Árboles con mayor infestación de muérdago.	11
6.	Mapa de distribución de muérdago en el mundo.	11
7.	Mapa de distribución de muérdago en la República Mexicana.	12
8.	Mapa que muestra los sitios infestados por muérdago en la zona urbana del Distrito Federal.	13
9.	Gráfica representativa de especies arbóreas más afectadas por muérdago en el Distrito Federal.	13
10.	Niveles de infestación en árboles por muérdago.	16
11.	Estructura química del fenol.	18
12.	Estructura base del esqueleto flavonoide.	19
13.	Estructuras de diversos grupos de flavonoides.	20
14.	Muérdago <i>Cladocolea loniceroides</i> : ejemplar, tallo con hojas e inflorescencias, corte histológico transversal y corte histológico longitudinal.	26
15.	Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno.	36
16.	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.	37
17.	Estructura del ABTS ^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante.	39
18.	Fotografía de <i>Cladocolea loniceroides</i> empleada.	48
19.	Álamo blanco sano y álamo blanco enfermo.	49
20.	Árbol álamo blanco de donde se realizó la recolección de <i>Cladocolea loniceroides</i> .	49
21.	Obtención de cinarina por precipitación.	53
22.	Estructura de la cinarina (1).	54
23.	Estructura de la (-)-epicatequina (2).	57
24.	Estructura de la (+)-catequina (3).	57
25.	Ecuación para calcular el porcentaje de actividad antioxidante de los extractos para el ensayo DPPH [•] .	60
26.	Fotografía del compuesto (1) y su respectiva CCD.	65



No. Figura	Contenido	No. Página
27.	Análisis por el método de LC-MS de cinarina (1).	66
28.	Modelo estructural en 3D de la cinarina.	67
29.	Fotografía del compuesto (2) y su respectiva CCD.	68
30.	Modelo estructural en 3D de la (-)-epicatequina.	69
31.	Espectro de RMN- ¹ H de (-)-epicatequina.	70
32.	Espectro de RMN- ¹³ C de (-)-epicatequina.	71
33.	Fotografía del compuesto (3) y su respectiva CCD.	72
34.	Modelo estructural en 3D de la (+)-catequina.	73
35.	Espectro de RMN- ¹ H de (+)-catequina.	74
36.	Espectro de RMN- ¹³ C de (+)-catequina.	75
37.	Perfil cromatográfico de 28 diferentes polifenoles.	77
38.	Cromatograma del extracto metanólico de <i>C. loniceroides</i> .	77
39.	Cromatograma del estándar de (-)-epicatequina.	78
40.	Cromatograma del estándar de (+)-catequina.	78
41.	Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de plantas evaluadas por el ensayo DPPH•.	82
42.	Estructura del ABTS y ABTS•• radical catión.	86
43.	Curva de calibración Trolox para el ensayo de DPPH•.	89
44.	Curva de calibración del Trolox para el ensayo de ABTS••.	89
45.	Correlación entre los equivalentes Trolox de los extractos de metanol para los ensayos DPPH• y ABTS••.	91

LISTA DE TABLAS

No. Tabla	Contenido	No. Página
1.	Clasificación de muérdagos.	6
2.	Registro de las principales plantas parásitas invasoras de algunas familias botánicas en el Distrito Federal.	15
3.	Composición química del muérdago <i>Viscum album</i> (Loranthaceae).	17
4.	Clasificación de flavonoides.	22
5.	Registro de hospederos del género <i>Cladocolea</i> .	27
6.	Formas de dosificación de <i>Cladocolea loniceroides</i> en fitoterapia tradicional.	29
7.	Clasificación de los antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción.	31



No. Tabla	Contenido	No. Página
8.	Estructura y actividad antioxidante de las principales catequinas.	33
9.	Clasificación de los modelos de ensayo <i>in vitro</i> según su modelo de reacción ET y HAT.	34
10.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	43
11.	Fraccionamiento secundario de la fracción CL-1 por cromatografía en columna abierta de gel de sílice 60G obtenida a partir del extracto de las hojas de <i>C. loniceroides</i> .	52
12.	Fraccionamiento terciario de la fracción CL-1-IX por cromatografía en columna abierta de Sephadex H-20.	53
13.	Fraccionamiento secundario de la fracción CL-2 por cromatografía en columna abierta de gel de sílice 60G obtenida a partir del extracto de las hojas de <i>C. loniceroides</i> .	55
14.	Fraccionamiento terciario de la fracción CL-2-XXVI por cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20.	56
15.	Volúmenes de dilución a partir de la solución stock.	59
16.	Porcentaje de la actividad antioxidante del extracto metanólico <i>C. loniceroides</i> por el ensayo de DPPH•.	81
17.	Porcentaje de la actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo de DPPH• para el extracto metanólico de <i>C. loniceroides</i> , evaluado a diferentes concentraciones.	83
18.	Concentración inhibitoria 50 de la actividad antioxidante para los extractos metanólicos.	84
19.	Porcentaje de actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS•+ para el extracto metanólico de <i>C. loniceroides</i> , evaluado a diferentes concentraciones.	85
20.	Porcentaje de la actividad antioxidante por el ensayo ABTS•+ para cada extracto de metanol activo y su respectiva concentración inhibitoria 50.	87
21.	Porcentaje de la actividad antioxidante a diferentes concentraciones de Trolox.	90
22.	Concentración en equivalentes Trolox de los extractos de metanol activos por los métodos de DPPH• y ABTS•+.	90



1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, en relativamente pocos años, se ha producido un llamativo incremento de muertes relacionadas con enfermedades degenerativas, no solo en los adultos sino también en jóvenes y niños. En la Figura 1 se resume las principales causas de muerte por enfermedades no contagiosas en México (OMS, 2013).

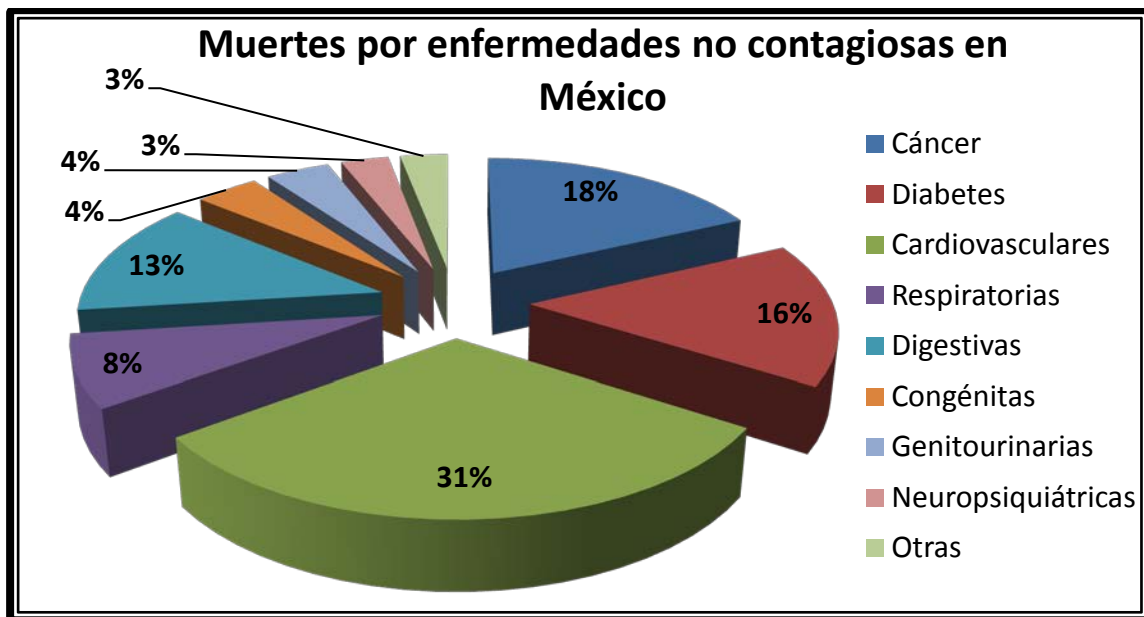


Figura 1. Muertes por enfermedades no contagiosas.

Por otra parte, es importante mencionar que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) 17.3 millones de personas murieron en todo el mundo durante el año 2008 a causa de distintas enfermedades cardiovasculares (ECV), cerebrovasculares y otras dolencias cardiacas por lo que constituyen la primera causa de muerte en todo el mundo.

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina "alternativa". La medicina tradicional se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido



INTRODUCCIÓN



enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad.

La medicina tradicional ha mantenido su popularidad en todo el mundo. A partir del decenio de 1990 se ha constatado un resurgimiento de su utilización en muchos países desarrollados y en desarrollo (WHO, 2013).

La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país, sus prácticas y recursos se encuentran profundamente arraigados en la sociedad. Las culturas indígenas de México herederas de una larga tradición prehispánica, han preservado formas y procedimientos eficaces para resolver problemas de salud de la población.

En los últimos años las personas han buscado en la medicina alternativa la cura para sus enfermedades; por ello actualmente se buscan dietas saludables y tratamientos de origen natural, éstos últimos surgidos inicialmente como un conocimiento empírico que se descifra sustancialmente incorporando avances tecnológicos al conocimiento científico. Por esa razón, existe un interés internacional para sistematizar la información y el uso de las plantas medicinales de cada región a partir de datos etnobotánicos y de trabajos de validación científica; por lo que es importante el estudio de productos naturales como un posible tratamiento de ECV, siendo ésta la principal causa de muerte en todo el mundo (Duarte, Pérez, Zarzuelo, Jiménez & Tamargo, 1993).

Los antioxidantes de plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas, los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de ésta manera prevenir o



INTRODUCCIÓN



retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Marwah *et al.* 2007).

El desarrollo de sustancias antioxidantes de fuentes naturales propias que puedan usarse en la industria de alimentos, farmacéutica y de otras especialidades químicas y biológicas, es de suma importancia, ya que a medida que se cuente con más estudios acerca de la capacidad antioxidante y de la estabilidad físico-química de éste tipo de moléculas, se podrá evaluar su empleo en la industria. El interés que ha despertado la bioactividad de los antioxidantes extraídos de plantas superiores se debe en parte, a su potencial beneficio a la salud para la prevención o cura de numerosas enfermedades (Larson, 1988).

Por ésta razón, se propuso el estudio del contenido de antioxidantes en el extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides*, además tomando en cuenta la importancia de diferenciar éste tipo de muérdago mexicano con el resto, considerando la facilidad de adquisición.



2. ANTECEDENTES

2.4. MUÉRDAGO VERDADERO

N. V.: Muérdago

N. C.: *Viscum album*

Familia: Lorantaceas

2.4.1. Definición de muérdago

Muérdago es el nombre común mediante el cual se designa a las plantas hemiparásitas semiparásitas que infestan árboles y arbustos para obtener de ellos agua y sales minerales, ya que son incapaces de absorberlas directamente del suelo. El muérdago toma los recursos que requiere en perjuicio del árbol que parasita. No existe la certeza del origen etimológico de la palabra, hay quien afirma que “muérdago” proviene del latín *mordicus*, es decir, mordedor (AMA, 2009).

2.4.2. Nombres comunes del muérdago

Muérdago es el nombre común de algunas plantas parásitas de la familia *Loranthaceae*; así como najtahuala (totonaco), tepalcatl (náhuatl) y mistletoe (inglés). Los muérdagos llamados “verdaderos” son plantas dicotiledóneas, siempre verdes, a las que también se les dice, en distintos lugares de América Latina, “injerto”, “matapalo”, “secapalo”, “palo de caballero”, “hierba de pájaro” y “planta de la liga” (AMA, 2009).

2.4.3. Aspectos históricos

En la Figura 2 se plasma una línea del tiempo de la historia de los usos del muérdago (Ara, 2004; AMA, 2009).

Historia de los usos del muérdago

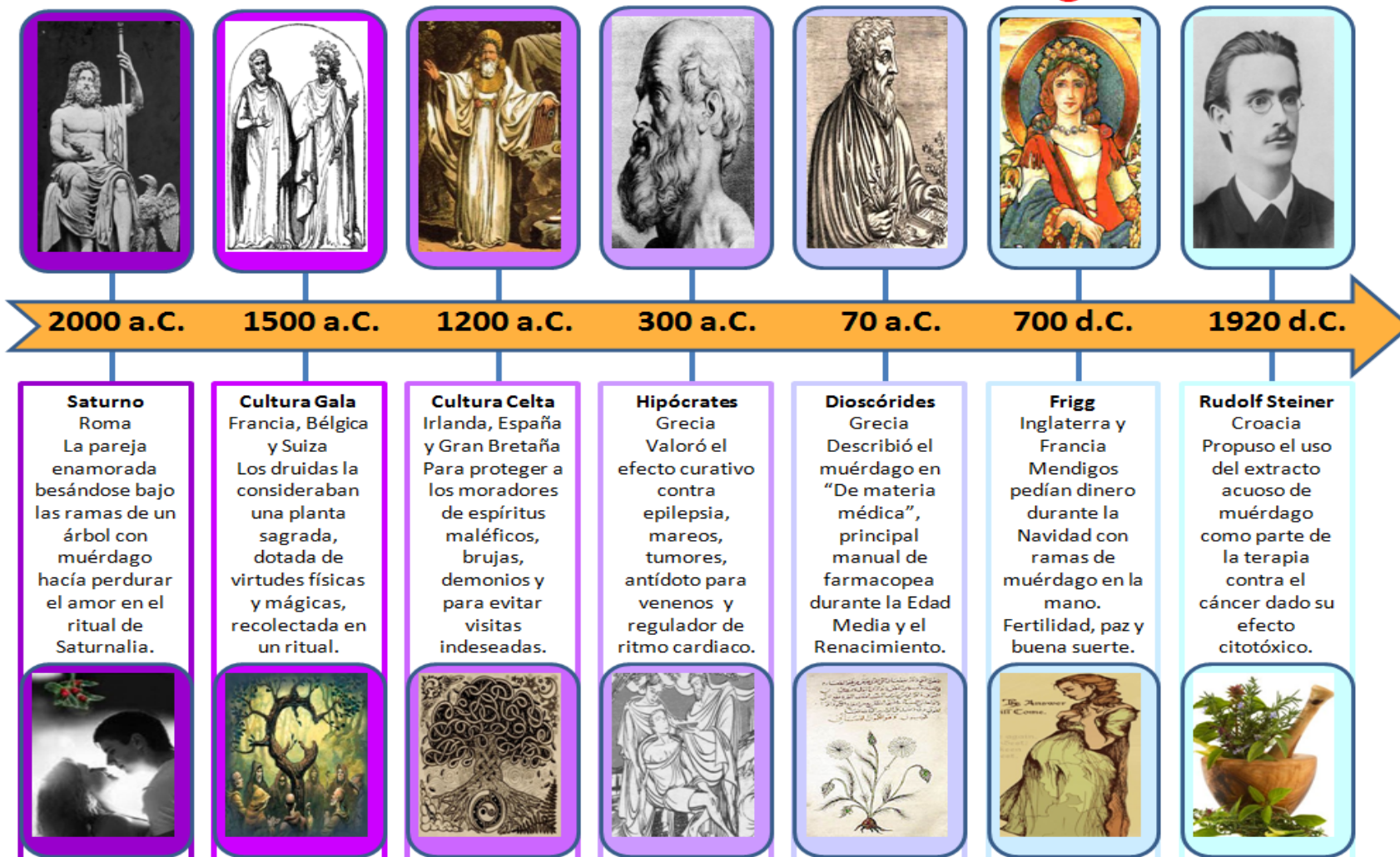


Figura 2. Línea del tiempo de la historia de los usos del muérdago.





2.4.4. Tipos de muérdago

Existen muy diversas clasificaciones de los muérdagos, lo cual muestra lo mucho que aún está por saberse y por determinarse de ellos. Una de estas clasificaciones señala que todos los muérdagos pertenecen a la familia Loranthaceae, agrupados en las subfamilias Loranthoidae (muérdagos gigantes o tropicales) y Viscoidae (muérdagos enanos o templados); sin embargo, otra clasificación más difundida divide a los muérdagos en dos familias, Loranthaceae y Viscaceae, como se muestra en la Tabla 1 (AMA, 2009). Ambas clasificaciones coinciden en que existen entre 1000 y 1500 diferentes especies de muérdago, distribuidas en todo el mundo.

Tabla 1. Clasificación de muérdagos.

GÉNEROS EN LA FAMILIA LORANTHACEAE: 76				
Actinanthella	Decaisina	Lampas	Oryctina	Tapinanthus
Acetanthus	Dendropemon	Lepeostegeres	Panamanthus	Taxillus
Agelanthus	Dendrophthoe	Lepidaria	Papuanthes	Tetradyas
Alepis	Desmaria	Ligaria	Pedistylis	Thaumasianthes
Amyema	Diplatia	Loranthus	Peraxilla	Tieghemia
Amylothea	Distrianthes	Loxanthea	Phragmanthera	Tolypanthus
Atkinsonia	Elytranthe	Lysiana	Phthirusa	Trilepidea
Bakerella	Emelianthe	Macrosolen	Plicosepalus	Tripodanthus
Baratranthus	Englerina	Moquiniella	Psittacanthus	Tristerix
Benthamina	Erianthemum	Muellerina	Rhizomonanthes	Trithecanthera
Berhautia	Gaiadendron	Notanthera	Scurrula	Tupeia
Botryoloranthus	Globimetula	Nuytsia	Septulina	Vanwykia
Cecarria	Helicanthes	Odontella	Socratina	
Cladocolea	Helixanthera	Oncella	Sogerianthe	
Cyne	Ileostylus	Oncocalix	Spragueanella	
Dactyliophora	Ixocactus	Oryctanthus	Struthanthus	
GÉNEROS EN LA FAMILIA VISCACEAE: 9				
Arceuthobium	Distichella	Korthalsella	Notothixos	Viscum
Dendrophthora	Ginalloa	Lepidoceras	Phoradendron	



2.4.5. Descripción botánica del muérdago

2.4.5.1. Características físicas

El muérdago es de apariencia redondeada, en general, tienen un tronco corto, ramas abundantes y repetidamente ahorquilladas, de manera que forman ya sea una densa mata que cuelga del árbol parasitado o bien una intrincada enredadera que cubre la copa del árbol. En la Figura 3 se pueden apreciar algunos componentes del muérdago.

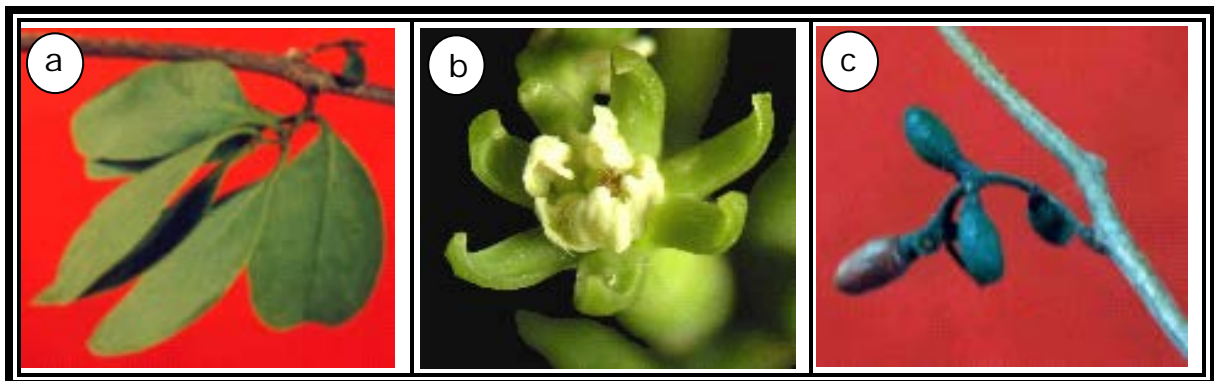


Figura 3. Partes de muérdago: a. hojas. b. flor femenina. c. semillas.

2.4.5.2. Ciclo biológico

El muérdago es una planta dioica, es decir, que existen pies machos y pies hembras separados. Tanto las flores masculinas como las femeninas son muy rudimentarias y simples, la polinización se realiza a través de aves, insectos y viento; éste hecho tiene lugar durante los meses de febrero y marzo. Una vez fecundadas, las flores dan lugar a unas bolas verdes que posteriormente van adquiriendo su aspecto característico de bayas, en el interior se alberga sólo una semilla rodeada de un tejido mucilaginoso y pegajoso.

Las semillas se adhieren a las ramas, gracias a la viscina que la hace mucilaginosa, germinan empezando a formar un engrosamiento en la rama donde forma los haustorios. Los haustorios son órganos succionadores de savia y se van introduciendo en los tejidos vasculares



del árbol, creando un abultamiento; posteriormente la planta emitirá un tallo exterior que tendrá como particularidad su gran potencia de succión de savia. Una vez fijada y establecida la planta de muérdago en el árbol, ésta se desarrolla de forma dicotómica bifurcándose anualmente en dos ramillas a partir de cada yema. Esta disposición da lugar a una mata semiesférica característica (REDFORESTA, 2010), ya establecido mantiene sus estomas ampliamente abiertos, por lo que tiene un potencial de agua más negativo que el del árbol. Así, succiona grandes cantidades de agua del árbol, en ocasiones más del doble del volumen que requeriría un área superficial equivalente del follaje del mismo, el sitio de infección se convierte en una estructura débil, por la que pueden entrar al árbol hongos, bacterias e insectos (AMA, 2009).

2.4.5.2.1. Aves que intervienen en la diseminación

Las semillas son diseminadas, principalmente, por las aves mostradas en la Figura 4.

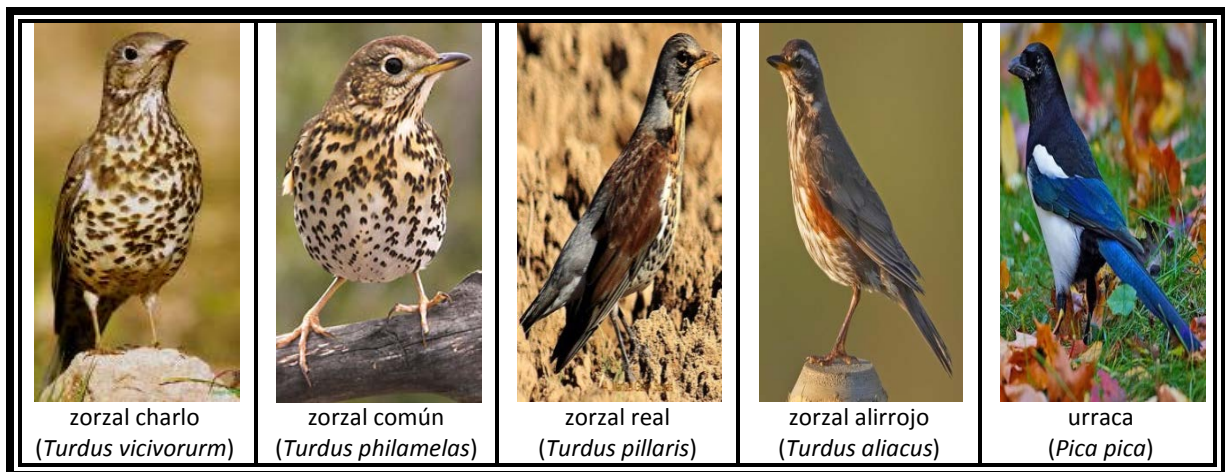


Figura 4. Principales aves responsables de la propagación del muérdago.

2.4.5.3. Hemiparasitismo

El muérdago siendo una planta hemiparásita depende del hospedante para obtener soporte, aunque realiza su propia función clorofílica y permanece verde durante todo el año, sintetiza sus alimentos orgánicos,



tomando del huésped el agua y las sales minerales. Estudios indican que además extraen del árbol otras sustancias carbonatadas (Coder, 2006).

2.4.5.4. Daño forestal

Podemos considerar al muérdago como el primer agente causal de daños con muerte de arbolado, especialmente en periodos de sequía, afectando en mayor medida a pinos y abetos en toda la geografía norte de la Península Ibérica.

Hasta la fecha no se ha descrito ningún tratamiento efectivo que pueda ser aplicable en grandes superficies de bosques. Es necesario indicar que los métodos preventivos, y con particularidad los tratamientos silvícolas con el rejuvenecimiento de las poblaciones atacadas y la eliminación periódica de todos los árboles afectados son fundamentales. Se debe evitar la eliminación de matorral arbustivo que produzca frutos que sirvan de alimento durante los inviernos y sean apetecibles al grupo de vertebrados de la zona forestal.

➤ Daños que ocasiona:

- Afecta el crecimiento en altura del árbol y el diámetro de las ramas.
- Reduce la producción.
- Sensibiliza al árbol a otros agentes patógenos.
- Aumenta el riesgo de rotura de las ramas.

2.4.5.5. Control del muérdago

Hoy día se poseen tres diferentes formas de control limitado del muérdago:

- Lucha biológica: Introduciendo pájaros que coman los frutos y que destruyan las semillas.



- Lucha química: Se han implementado métodos de control químico llevados a cabo mediante inyecciones y pulverizaciones de herbicidas en el tronco y ramas.
- Lucha física: Por último se ha hecho uso de utensilios para separar el muérdago del árbol, la única forma de controlarlo es eliminándolo de los árboles una vez al año antes de que aparezca la semilla del muérdago, para evitar su propagación, con la incidencia de que tiende a reaparecer después de algún tiempo; en casos de infestación severa, el único remedio es derribar el árbol (De la Paz Pérez, Ceja y Vela, 2006), aunque es preciso encontrar alguna forma de aprovechamiento y procesamiento de éstos residuos (Serrano, Guerrero, De la Paz Pérez y Soriano, 2011).

Actualmente en México se ha controlado medianamente con el derribo de los pinos y árboles infectados severamente, sin embargo, aún no se conoce un método adecuado para el control de ésta planta parásita. Ésta infestación afecta en forma directa la producción de madera y frutícola del país. Por otro lado, ésta planta sirve como alimento de varias especies de aves que consumen los frutos, por lo que no resulta aconsejable su total eliminación de la zona donde aparece (Cid, Ponce & Engleman, 2005; Cházaro, Oliva, Ramón y Vázquez, 2005).

2.4.6. Especies arbóreas infectadas por muérdago

El muérdago crece sobre las ramas de algunos árboles como sauces, álamos, encinos, olmos, manzanos, abedules, ciruelos, perales, pinos, chopos, coníferas, en menor medida en pinos y otras especies resinosas. En la Figura 5 se muestran los géneros de árboles con mayor infestación de muérdago (INIFAP, 2009).

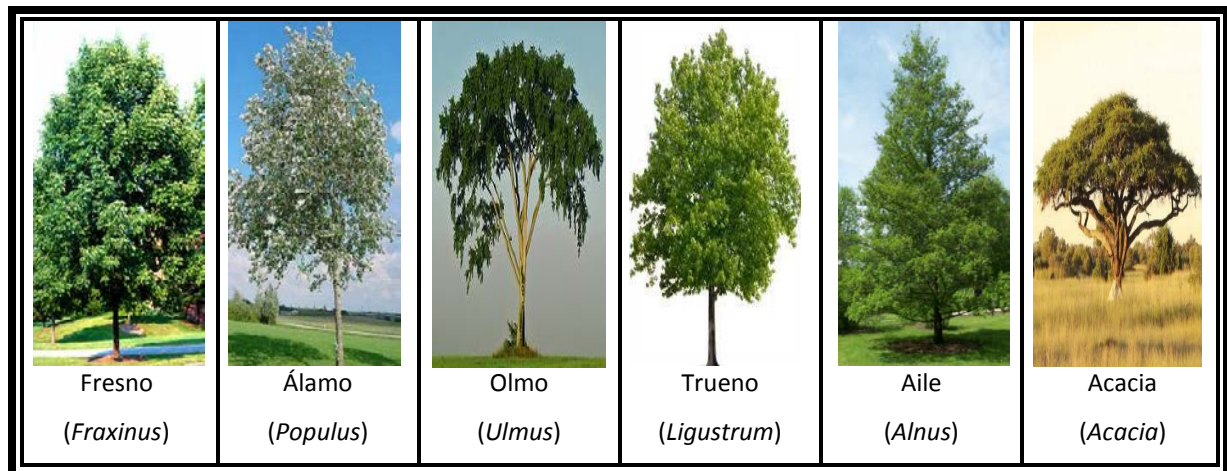


Figura 5. Árboles con mayor infestación de muérdago.

2.4.7. Distribución geográfica del muérdago

2.4.7.1. El muérdago en el mundo

Varias especies de ésta planta se encuentran en lugares como América del Norte, Asia, Europa, Australia y Corea. Algunos países europeos, en donde predominan las coníferas, tienen una importante presencia de *Viscum album*. En el sureste de USA, todos los muérdagos pertenecen al género *Phoradendron*. En Chile, encontramos *Tristerix aphyllus*, pero en la mayoría de los países sudamericanos prevalece *Tripodanthus acutifolius*; en la Figura 6 se muestra un mapa de la distribución de muérdago en el mundo (AMA, 2009).



Figura 6. Mapa de distribución de muérdago en el mundo, señalado en puntos color rojo.



2.4.7.2. El muérdago en la República Mexicana

La Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) reporta presencia de muérdago en la mayoría de los estados, y se habla de problemas severos en Michoacán, Veracruz, Tlaxcala, Morelos, Oaxaca, Guerrero y Querétaro (AMA, 2009), ver Figura 7.



Figura 7. Mapa de distribución de muérdago en la República Mexicana, señalado en puntos color rojo.

2.4.7.3. El muérdago en la Ciudad de México

En la actualidad, en la Ciudad de México se encuentran árboles y arbustos infestados por:

- *Struthanthus quercicola*
- *Cladocolea loniceroides*
- *Phoradendron velutinum*
- *Struthanthus sp.*
- *Psittacanthus calyculatus*
- *Arceuthobium sp.*
- *Cladocolea sp.*

La distribución del muérdago en el Distrito Federal se muestra en la Figura 8 mientras que en la Figura 9 se muestran las especies arbóreas más afectadas por muérdago en el Distrito Federal (INIFAP, 2009).



Figura 8. Mapa que muestra los sitios infestados por muérdago en la zona urbana del Distrito Federal, señalados en puntos color rojo.

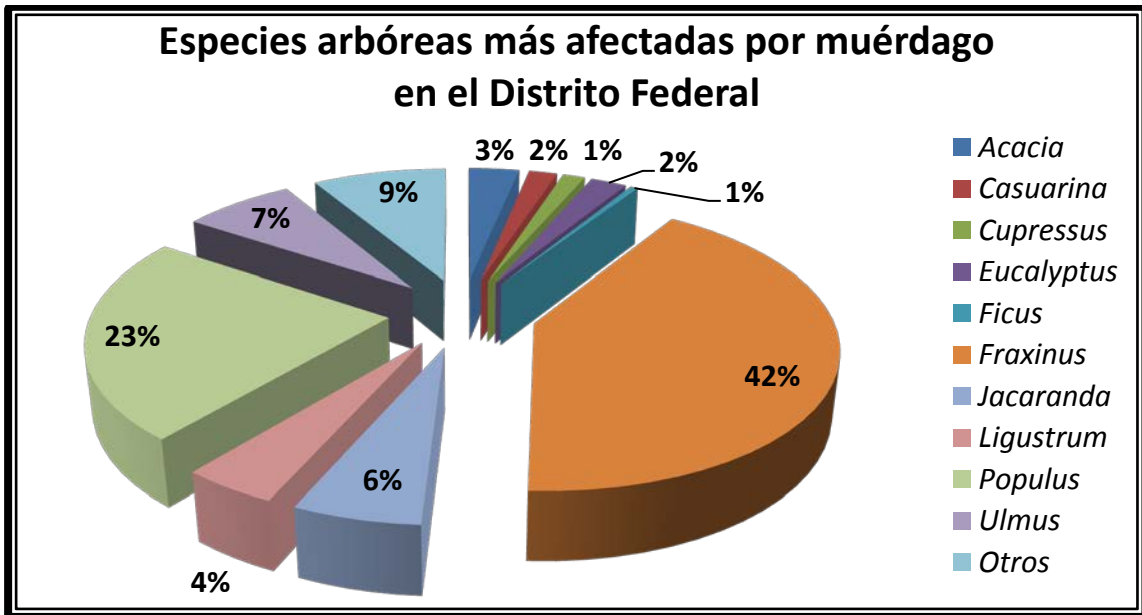


Figura 9. Gráfica representativa de especies arbóreas más afectadas por muérdago en el Distrito Federal.



Algunas plantas parásitas muestran una cierta especificidad por la especie e incluso por la variedad del hospedero que prefieren.

Hace años, en la Ciudad de México podía observarse una cierta diferencia entre las especies arbóreas que cada una de las dos principales especies de muérdago prefería; *Struthanthus quercicola* elegía truenos, jacarandas, alamillos y ahuehuetes; en cambio, *Cladocolea loniceroides* le gustaban más los fresnos, los olmos chinos y los sauces; podían incluso observarse dos regiones más o menos definidas por una u otra especie pero con el paso del tiempo no es difícil encontrar especies con los dos muérdagos, incluso simultáneamente. También es cierto que cada vez hay menos especies arbóreas totalmente libres de algún muérdago (AMA, 2009).

De la Paz Pérez, Ceja y Vela en el 2006, señalaron que de las 68 especies arbóreas que conforman las áreas verdes de la Ciudad de México, el 95% de ellas están afectadas por algún muérdago.

Se muestrearon áreas verdes en las delegaciones del D.F., analizando familias botánicas susceptibles al muérdago y otras plantas parásitas; con ello se encontraron los registros vistos en la Tabla 2 (Sandoval y Gutiérrez, 2006).



ANTECEDENTES



Tabla 2. Registro de las principales plantas parásitas invasoras de algunas familias botánicas en el Distrito Federal.

Familia botánica	Plantas parásitas			
	<i>Cladocolea loniceroides</i>	<i>Cuscuta corymbosa</i>	<i>Phoradendron velutinum</i>	<i>Struthanthus quercicola</i>
Ahuejote				✓
Aile	✓		✓	✓
Álamo	✓			✓
Capulín	✓		✓	
Casuarina	✓	✓		✓
Ciruelo			✓	
Durazno			✓	
Eucalipto	✓			✓
Fitolaca	✓			
Fresno	✓	✓		✓
Jacaranda	✓			✓
Limón	✓			✓
Olmo	✓			
Pirul	✓	✓		
Sauce llorón				✓
Tejocote			✓	
Tepozán	✓			
Trueno	✓	✓		✓

En la Figura 10 (AMA, 2009) se puede apreciar el grado variable de infestación de zonas muestreadas, ya que se encontraron tanto árboles sanos como árboles severamente infestados, en una proporción aproximada de:

- 17% árboles sanos
- 25% infestación media
- 29% infestación leve
- 29% infestación severa

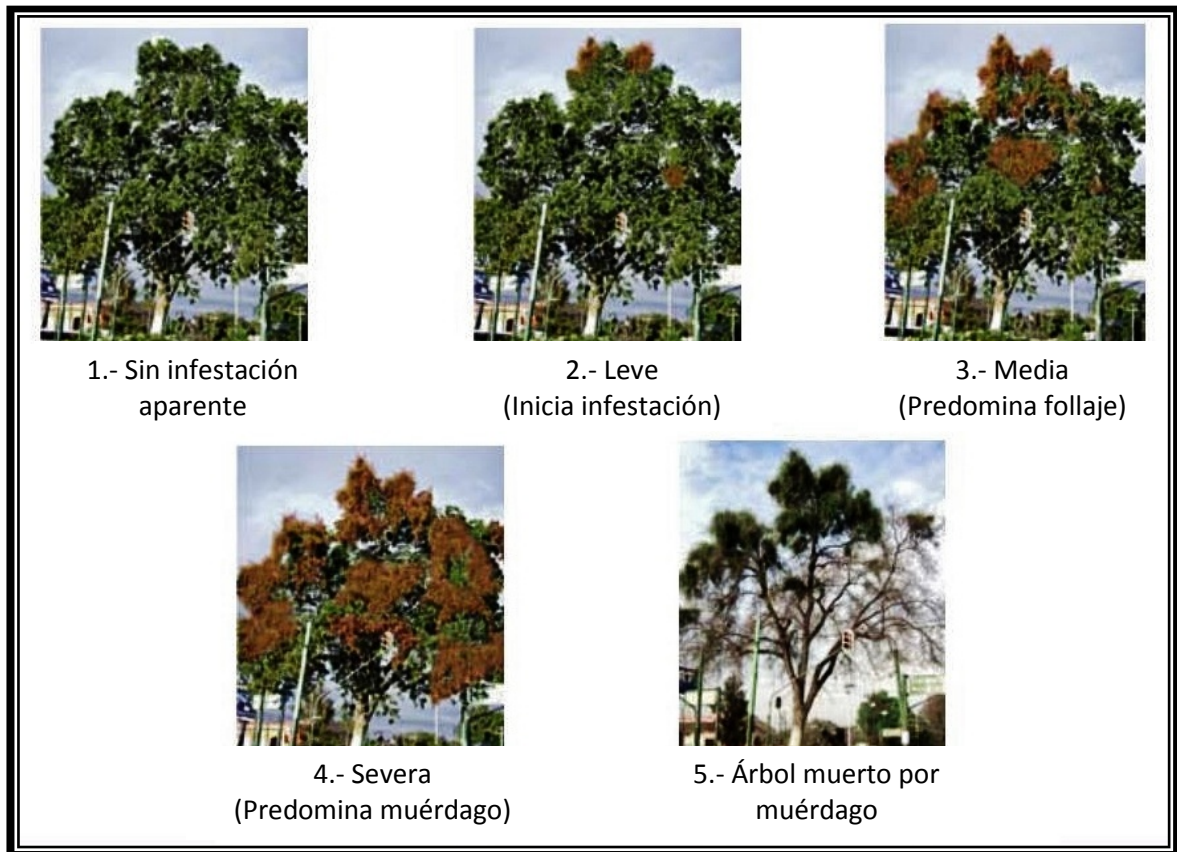


Figura 10. Niveles de infestación en árboles por muérdago.

Los especialistas están de acuerdo en que los árboles urbanos son más susceptibles de ser infestados por muérdago, dadas las condiciones deplorables en las que sobreviven; es decir, en un permanente estado de estrés provocado, la compactación, la pobreza del suelo, la excesiva pavimentación, la plantación de árboles en sitios inadecuados, la contaminación de aire, agua y suelo, la excesiva radiación solar, riego casi nulo o nulo, sobrepoblación, inexistencia de un programa de manejo del muérdago, podas mal hechas, interferencias con la infraestructura y el equipamiento urbano (en donde el árbol siempre sale perdiendo); la suma de todo ello los hace presa fácil de plagas y enfermedades (AMA, 2009).



2.4.8. Composición química

Está conformada por flavonoides, alcaloides, lectinas, histamina, polisacáridos, fenilpropanos, lignanos, aminas, viscina, aminoácidos, derivados glucosídicos, glucoproteínas, polipéptidos, ácido víscico, saponósidos, triterpenoides y lípidos (Sinha, Taylor, Khan, McDaniel & Esko, 1999; Park, Hyun & Shin, 1999), ver Tabla 3 (Drogas más comunes de la medicina tradicional Argentina, 2011).

Tabla 3. Composición química del muérdago *Viscum album* (Loranthaceae).

Tipo de compuesto	Ejemplo
Lectina	Viscumina
Fenil-propanos y lignanos	Siringenina 4'-glucósido
	Siringarresinol 4'-4''-diglucósido (eleuterósido E)
	Metil-mucoinositol
Flavonoides	Flavonoles
	Flavanonas
	Flavanodiolos
	Chalconas
	Derivados de la quercetina
Aminas	Tiramina
	Colina
	Histamina
	Propionilcolina
Alcaloides	Viscalbina
	Viscotoxinas
	Ácido cafeico
Polisacáridos	Galacturanos
	Arabinogalactanos
Glucósidos	Saponósidos
	Viscoflavina
Neurotransmisores	Acetil-colina
Triterpenos	β -amirina
	Lupeol
	Ácido oleanólico
	Ácido ursólico
Fitosteroles	Estigmasterol
	Esterol A
	β -sitosterol



2.4.8.1. Compuestos fenólicos

Las plantas de muérdago producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol; los fenoles son alcoholes aromáticos compuestos de moléculas que tienen un grupo –OH (hidroxilo) unido a un átomo de carbono de un anillo bencénico (ver Figura 11).

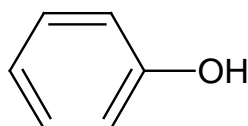


Figura 11. Estructura química del fenol.

El fenol, C_6H_5OH , es el nombre dado al alcohol aromático más sencillo. Estas sustancias se clasifican como compuestos fenólicos.

2.4.8.2. Flavonoides

Es un grupo de compuestos presentes en muchas especies vegetales, con diversas actividades farmacológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiana, algunos con potencial actividad anticarcinogénica o cardioprotectora.

Éstos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien aisló a partir de la cáscara de limón una sustancia en 1930, la citrina, que regula la permeabilidad de los capilares (Singleton, Orthofer & Lamuela, 1981).

Los flavonoides se denominaron primeramente como vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C_2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C. Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Singleton *et al.*, 1981).



Etimológicamente la palabra flavonoide deriva del latín *flavus* que significa "amarillo", pero en la actualidad se han encontrado flavonoides de colores rojos, violetas y azules; los flavonoides se encuentran en la naturaleza tanto en su estado libre como glicosilado y constituyen el grupo de los fenoles naturales (Bruneton, 2002).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, especialmente en las angiospermas, pero han sido detectados algunos en hongos y algas. Se encuentran especialmente en partes aéreas, en tejidos superficiales, y se les encuentra en forma libre (agliconas flavonoides), como glicósidos, sulfatos y algunas veces como dímeros o polímeros (Törrönen, Häkkinen, Kärenlampi & Mykkänen, 1997). Los glicósidos se pueden diferenciar por el tipo de enlace, habiendo de dos tipos: *C*-glicósidos y *O*-glicósidos, siendo los segundos los más frecuentes (Li, Matsunaga, Kato & Ohizumi, 1996).

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena policetídica, un anillo B, derivado del ácido siquímico y tres átomos de carbono que conectan a los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropanoide, por eso se les conoce como compuestos $C_6-C_3-C_6$ (Figura 12).

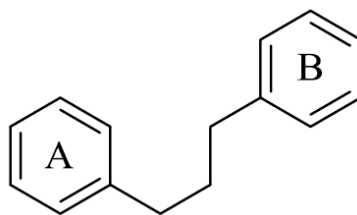


Figura 12. Estructura base del esqueleto flavonoide.

Entre las distintas estructuras se encuentran con cadena abierta (chalconas) formando un heterociclo (γ -pironas), polimerizaciones que ocurren principalmente por uniones C-C etc., a continuación se presenta



una figura con diversos grupos estructurales de flavonoides (Figura 13, Harborne, 1984). Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y de 3 malonil-CoA, a través de lo que se conoce como “vía biosintética de los flavonoides”, cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa.

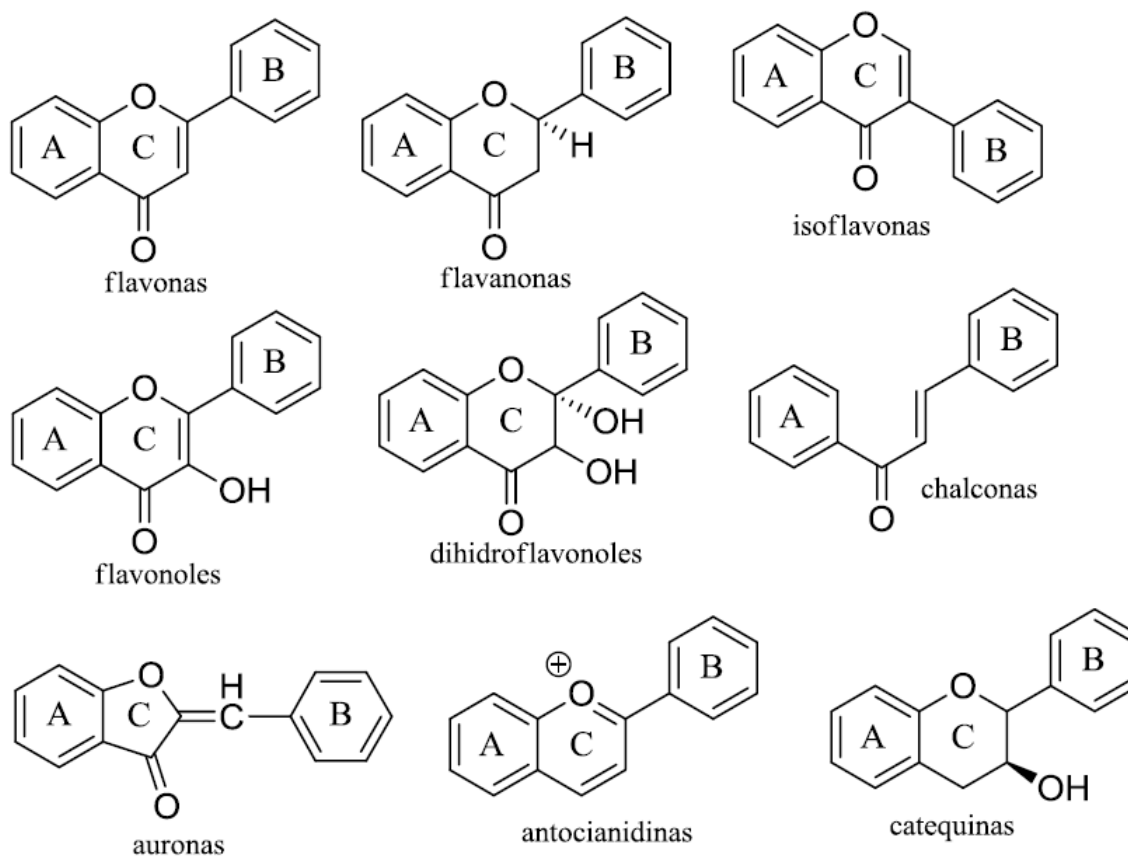


Figura 13. Estructuras de diversos grupos de flavonoides.

Los flavonoides se originan por biogénesis mixta; el anillo A proviene de la ruta de los policétidos, el anillo B y la cadena C₃ se originan de la ruta del ácido siquímico, como se denota en la Diagrama 1 (Harborne, 1984).



ANTECEDENTES

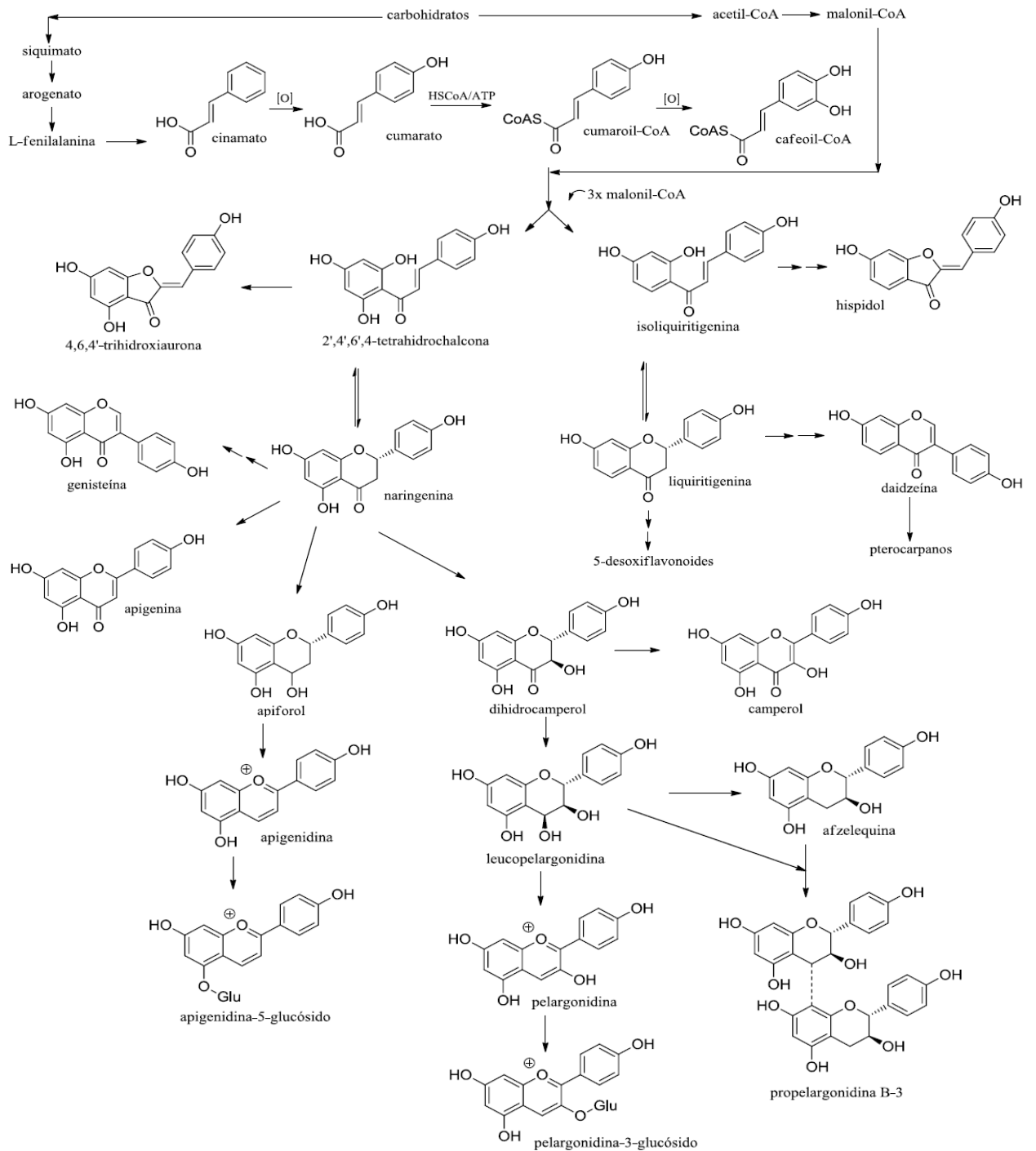


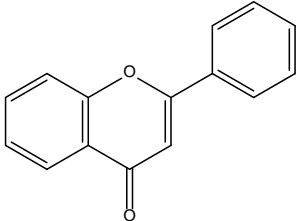
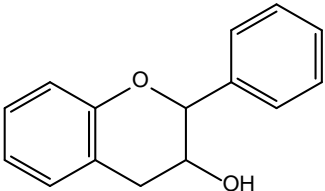
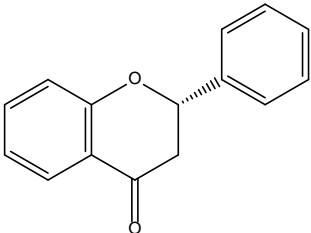
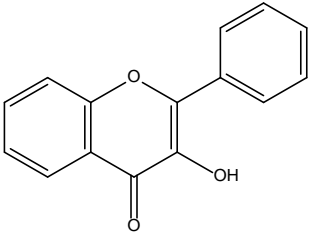
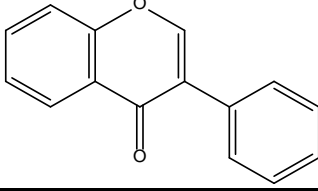
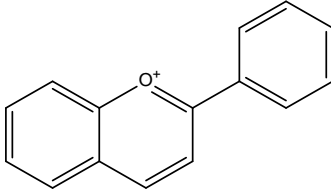
Diagrama 1. Ruta biosintética de flavonoides.

Los flavonoides se subdividen habitualmente en flavonas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, isoflavonas y antocianidinas, en función de sus



características estructurales como se indica en la Tabla 4 (Heim, Tagliaferro & Bobilya, 2002).

Tabla 4. Clasificación de flavonoides.

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.
Isoflavonas		Genisteína Genistina Daidzina Daidzeína	Soya
Antocianidinas		Apigenidina Cianidina Malvidina	Frutas coloreadas (cereza, frambuesa, fresa, uva, mora azul) y vino tinto



2.4.9. Usos y propiedades medicinales

2.4.9.1. Usos no farmacológicos del muérdago

Cada día va siendo más habitual el ver las ramas de muérdago como adorno navideño en el interior de los hogares.

2.4.9.2. El muérdago y la Medicina

El muérdago europeo se utiliza para reducir la presión arterial y disminuir la frecuencia cardíaca rápida, aliviar el nerviosismo e inducir el sueño. Cuando se utiliza en pequeñas dosis, el muérdago ayuda a proporcionar alivio de los dolores de cabeza, ataques de pánico. Los herbolarios prescriben especialmente muérdago europeo para tratar la epilepsia y el tinnitus (una sensación de zumbido en el oído). En homeopatía se emplean en arteriosclerosis y mareos, sus partidarios sostienen que los extractos de muérdago estimulan el sistema inmunológico pero interacciona negativamente con medicamentos antihipertensivos y diuréticos (Nogué, Simón, Blanché y Piqueras, 2009).

Un extracto acuoso estandarizado del muérdago europeo *Viscum album* y *V. coloratum* con actividad citotóxica, se utiliza en clínicas de Alemania y Suiza desde hace más de 80 años como coadyuvante en la terapia de diferentes tipos de cáncer (Khwaja, 1996) reduciendo los efectos adversos de la quimioterapia y radioterapia (AMA, 2009).

2.4.9.3. Manifestaciones clínicas

2.4.9.3.1. Toxicidad

Se debe hacer hincapié en el hecho de que las bayas de muérdago son tóxicas para los humanos y nunca deberían usarse según Murray, Birdsall, Pizzorno y Reilly, 2004, (véase la Advertencia).



Advertencia

Los preparados orales de muérdago pueden ser muy tóxicos. Los efectos adversos en dosis más reducidas incluyen una presión sanguínea baja y una reducción del ritmo cardíaco. En niveles más altos, los efectos adversos pueden incluir alucinaciones, delirios, hipertensión, gastroenteritis, náuseas, vómitos, y diarrea. En niveles tóxicos, los efectos adversos incluyen la rotura de los glóbulos rojos (hemólisis), hemorragia, convulsiones, e incluso la muerte. Los casos de envenenamiento fatal se han producido como resultado de comer bayas del muérdago. Es un problema especial para los niños, que pueden sentirse atraídos por las bayas rojas y además son más susceptibles a las toxinas. No utilices nunca muérdago real para las decoraciones navideñas, especialmente si en tu casa viven niños o animales domésticos.

En dosis altas puede llegar a causar la muerte, o al menos serios problemas de salud. Kim Coder señala que la toxicidad del muérdago varía de acuerdo con la especie del árbol sobre el cual creció (Coder, 2006). Se maneja como precaución el no abusar de este preparado.

Por su contenido en tiramina, el muérdago puede desencadenar crisis hipertensivas en pacientes que están siguiendo un tratamiento antidepresivo con inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) (Castroviejo *et al.*, 1997).

2.4.9.3.2. En caso de abuso de ingestión

En general no es necesario ningún tipo de tratamiento. En caso de ingestión notable del vegetal debe inducirse el vómito, realizar un lavado gástrico o administrar carbón activado; tratamiento sintomático y de soporte si aparecen alteraciones cardiocirculatorias y/o neurológicas; el gluconato cálcico por vía endovenosa ha demostrado tener un efecto beneficioso como antídoto de las viscotoxinas. El pronóstico es generalmente favorable (Nogué *et al.*, 2009).



2.5. ESPECIE *Cladocolea Ioniceroides*

2.5.1. Nombres comunes

El género *Cladocolea* es comúnmente conocido como muérdago verdadero o injerto.

2.5.2. Clasificación taxonómica de *Cladocolea Ioniceroides*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Santalales

Familia: Loranthaceae

Género: *Cladocolea*

Especie: *Cladocolea Ioniceroides* (Kuijt, 1992)

2.5.3. Descripción botánica

2.5.3.1. Descripción macroscópica de *Cladocolea Ioniceroides*

Parasita órganos aéreos de plantas leñosas, se establece sobre especies potencialmente maderables. Son arbustos por lo general dioicos, usualmente glabros, parásitos de plantas leñosas; tallos cilíndricos o aplanados, erguidos o volubles; hojas laminares, opuestas o alternas, con frecuencia coriáceas, penninervadas; comúnmente flores dispuestas en racimos. El género *Cladocolea* se distingue de *Dendropemon*, *Oryctanthus*, *Phthirusa* y *Struthanthus* por las flores terminales (inflorescencia determinada) y por la falta de bractéolas (Kuijt, 1975), con base en inoculaciones artificiales, se sabe que las yemas florales pueden aparecer en tan solo 280 días.



En la Figura 14 se puede observar algunos componentes del muérdago *Cladocolea loniceroides* (INIFAP, 2009).

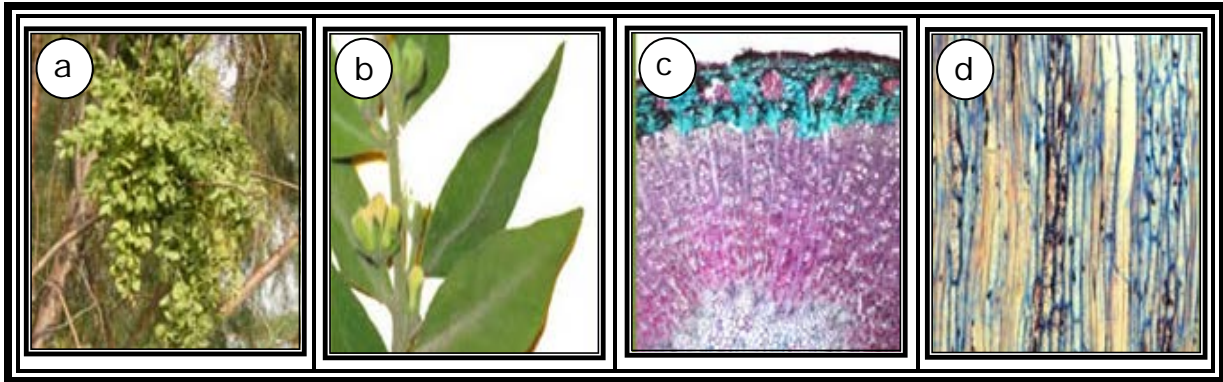


Figura 14. Muérdago *Cladocolea loniceroides*: a. ejemplar. b. tallo con hojas e inflorescencias. c. corte histológico transversal. d. corte histológico longitudinal.

2.5.4. Hospedantes del género *Cladocolea*

Casi todas las especies de la familia Loranthaceae son parásitas de árboles tropicales. El género *Cladocolea*, se encuentra en especies de árboles de porte, diámetro de fuste y diámetro de copa pequeños. En la Tabla 5 se puede observar el registro de hospederos invadidos por el género *Cladocolea* (Kuijt, 1975 y 1992; Cházaro *et al.*, 1992; Saavedra *et al.*, 2006; USDA, 2002).

2.5.5. Distribución geográfica de *Cladocolea loniceroides*

Cladocolea loniceroides es un muérdago neotropical que se distribuye desde el cinturón volcánico transversal hasta el sur de México. Se reportan cerca de 20 especies principalmente en México; también en Centro y Sudamérica, parasitando hojas de base ancha y terminada en punta fina (latifoliadas) principalmente, aunque también se encuentra en las coníferas, siendo los sauces (género *Salix*) uno de los más severamente afectados. Se encontró que *Cladocolea loniceroides* se distribuye en al menos 11 estados de la República Mexicana (Alvarado y Saavedra, 2006), a lo largo del Océano Pacífico y el Golfo de México; se



Tabla 5. Registro de hospederos del género *Cladocolea*.

Especie	Hospedero	Especie	Hospedero	
<i>C. andrieuxii</i>	<i>Alnus jorullensis</i>	<i>C. loniceroides</i>	<i>Prunus serotina</i>	
	<i>Quercus</i>		<i>Quercus</i>	
<i>C. coyucaae</i>	<i>Trevelia</i>		<i>Rumfordia</i>	
	<i>Heliocarpus</i>		<i>Salix bonplandiana</i>	
<i>C. cupulata</i>	<i>Pinus</i>		<i>Salix humboldtiana</i>	
	<i>Pinus jaliscana</i>		<i>Salix babylonica</i>	
	<i>Pinus lumholtzii</i>		<i>Solanum refractum</i>	
<i>C. glauca</i>	<i>Acacia</i>		<i>Vernonia</i>	
	<i>Crataegus</i>		<i>Compositae</i>	
<i>C. gracilis</i>	<i>Columbrina</i>		<i>Leguminosae</i>	
	<i>Podopterus mexicanus</i>		<i>Malvaceae</i>	
	<i>Randia</i>		<i>Quercus aristata</i>	
<i>C. grahami</i>	<i>Quercus</i>		<i>C. mcvaughii</i>	<i>Quercus macrophylla</i>
<i>C. hintonii</i>	<i>Quercus</i>			<i>Quercus</i>
<i>C. incospicua</i>	<i>Croton niveus</i>	<i>C. microphylla</i>	<i>Alnus</i>	
	<i>Mimosa palmeri</i>		<i>Quercus</i>	
	<i>Randia</i>		<i>Pinus leiophylla</i>	
	<i>Zanthoxylum</i>		<i>P. montezumae</i>	
<i>C. inorna</i>	<i>Cassia</i>		<i>P. pseudostrobus</i>	
<i>C. loniceroides</i>	<i>Alnus</i>	<i>C. oligantha</i>	<i>Bursera bipinnata</i>	
	<i>Baccharis</i>		<i>Bursera tomentosa</i>	
	<i>Eupatorium</i>		<i>Bursera</i>	
	<i>Fraxinus uhdei</i>		<i>Lysiloma</i>	
	<i>Ligustrum</i>	<i>C. pedicellata</i>	<i>Acacia</i>	
	<i>Ligustrum japonicum</i>		<i>Quercus</i>	
	<i>Ostrya virginiana</i>	<i>C. pringlei</i>	<i>Quercus</i>	
	<i>Ostrya</i>	<i>C. stricta</i>	<i>Salix</i>	
	<i>Populus sp.</i>	<i>C. tehuacanensis</i>	<i>Pinus</i>	
	<i>Populus tremuloides</i>	<i>C. racemosa</i>	<i>Pinus</i>	

le encuentra a una altura de 3900 msnm, en las altas montañas del eje volcánico pasando por todos los tipos de vegetación intermedia.

En cuanto a su distribución en el Distrito Federal podemos hallar *Cladocolea loniceroides* en la zona chinampera de Xochimilco, patrimonio de la humanidad por declaración de la UNESCO en 1987 (Serrano, 2010).



2.5.6. Época de recolecta

La maduración del fruto del muérdago en general se produce en las primeras semanas del invierno, dependiendo del biotopo en el que esté establecido, en el caso de *Cladocolea loniceroides* los frutos maduran entre agosto y diciembre, germinan durante la primavera. Los frutos sirven de alimento para gran cantidad de animales, especialmente pájaros que son los que intervienen de una forma más directa en la diseminación.

2.5.7. Usos de *Cladocolea loniceroides*

2.5.7.1. Etnobotánica

Los extractos del tallo, hojas y frutos de *Cladocolea loniceroides* tienen una alta capacidad para combatir el estrés oxidativo (ID, 2012). Es importante mencionar que aún no se sabe con exactitud la posología de *Cladocolea loniceroides*.

2.5.7.1.1. Formas de dosificación a nivel popular

Partes usadas: Hojas, ramas y bayas.

Esta hierba se puede tomar en varias formas, incluyendo la infusión en frío, infusión caliente, tintura, polvo, hierba seca y extracto fluido (ver Tabla 6, SEPEAP, 2003).

2.5.8. Efectos secundarios y precauciones

Tomar grandes dosis de muérdago puede tener una acción nociva sobre el funcionamiento del corazón. Incluso el consumo de las bayas de esta planta parásita puede llegar a ser peligroso, especialmente para los niños y mascotas. Las personas que toman preparaciones terapéuticas con muérdago pueden experimentar efectos secundarios adversos como la deshidratación, fiebre leve a grave, diarrea, convulsiones, delirio e incluso alucinaciones. Esta hierba o sus preparaciones no deben



Tabla 6. Formas de dosificación de *Cladocolea loniceroides* en fitoterapia tradicional.

Forma de dosificación	Indicaciones
 <p>Polvo</p>	Se toma 1 g al día, administrado en forma de cápsulas. Esta dosis puede aumentarse hasta 4 g para conseguir una acción espasmolítica.
 <p>Infusión fría</p>	Preparar una infusión en frío mediante la adición de 2.5 g de hojas frescas en rodajas de muérdago y déjelo en remojo a temperatura ambiente durante alrededor de 10 a 12 h. Las hojas frescas son preferidas a las hojas secas, ya que se consideran más activas. Tomar una o dos tazas de esta infusión en frío todos los días.
 <p>Infusión caliente</p>	La infusión caliente preparada con muérdago se prepara con 2 a 6 g de hojas secas empapadas en agua caliente. Para obtener los mejores resultados, tome esta infusión tibia tres veces al día.
 <p>Tintura</p>	Tintura de muérdago se prepara utilizando las hojas y alcohol (40 a 50 %) en la proporción de 1:4. La dosis estándar de la tintura se toma de 10 a 60 gotas tres veces al día o 0.5 mL dos veces al día.
 <p>Extracto fluido</p>	El extracto líquido obtenido a partir de hojas de muérdago se diluye en alcohol (25 a 50 %) en la proporción de 1:1. Tome el extracto fluido en la dosis de 25 a 60 gotas tres veces al día, o, alternativamente, 1 mL a 3 mL tres veces al día.
 <p>Secado de hierbas</p>	La dosis normal de la hierba seca es de 9 g a 16 g cada día. Si se administra la hierba por vía parenteral (administración de un medicamento en el cuerpo de una manera que no sea el tracto digestivo), lo que es cierto para un producto determinado importado de Europa, es esencial seguir estrictamente las instrucciones del fabricante.



utilizarse durante el embarazo o dar a las madres lactantes (Murray *et al.*, 2004).

2.5.9. Toxicidad de *Cladocolea Ioniceroides*

Se ha reportado un débil efecto citotóxico en artemia salina del extracto metanólico del tallo de *C. Ioniceroides* (Morales *et al.*, 2010). Se ha observado un efecto antimicrobiano asociado al contenido de metabolitos secundarios de polaridad alta (Durán *et al.*, 2010).

2.6. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante ha sido definido como aquella sustancia que presenta bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable, que retarda o previene su oxidación. Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres; son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas (Larson, 1988).

La oxidación se produce cuando un átomo o grupo de átomos ceden electrones. De forma simultánea, se produce la correspondiente reacción de reducción que implica la captación de los electrones por otro átomo diferente o grupos de átomos. Las reacciones de oxidación pueden o no incluir la adición de átomos de oxígeno o la pérdida de átomos de hidrógeno de la sustancia que está oxidando. Las reacciones de óxido-reducción son comunes en los sistemas biológicos (lipoperoxidación, β -oxidación, respiración, etc.) y también en los alimentos. Si bien algunas reacciones de oxidación son beneficiosas para los alimentos, otras son



perjudiciales como ocurre con la degradación oxidativa de las vitaminas, pigmentos y lípidos (Reynoso, 1998).

2.6.1. Clasificación de los antioxidantes

Antes de que se desarrollara una tecnología química específica para el control de los radicales libres responsables de la oxidación de los lípidos, el término “antioxidante” se aplicó a todas las sustancias que inhibían las reacciones de oxidación, independientemente de su mecanismo de acción.

Actualmente, existen en general dos grupos de antioxidantes, clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción. En primer término, se presentan los antioxidantes preventivos o primarios, los cuales actúan al inicio del proceso de oxidación, reduciendo la frecuencia de inicio de una cadena de oxidación, y los antioxidantes secundarios que actúan bloqueando dicha cadena (chain-breaking) y captan radicales directamente, atacando por tanto, la longitud de la cadena de oxidación (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de los antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción.

ANTIOXIDANTES		
Primarios	Secundarios	Terciarios
<p>Previene la formación de nuevas ERO, esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. En éste grupo se destacan las siguientes enzimas (Katalinic, Modun, Music & Boban, 2005):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutasa (SOD) • Glutación peroxidasa (GPx) • Catalasa 	<p>Capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena p. e. (Doria, Buonocore, Focarelli & Marzatico, 2012):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vitamina E • Vitamina C • β-caroteno • Glutación urato • Bilirrubina • Ubiquinona 	<p>Son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas, se incluyen las enzimas (Page <i>et al.</i>, 2009):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Endonucleasa apurínica • Endonucleasa apirimidínica • Polimerasa β • Metionina sulfóxido reductasa



De acuerdo a su naturaleza química, los antioxidantes han sido clasificados también como:

- No enzimáticos (secuestradores de radicales libres y especies reactivas, vitamina C y E, β -carotenos, flavonoides, ácido úrico, bilirrubina, etc.).
- Enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa).

2.6.1.1. Actividad antioxidante de los flavonoides

Los flavonoides han mostrado una fuerte actividad antioxidante en sistemas *in vitro*, principalmente gracias a su bajo potencial de oxidación lo que les confiere capacidad de estabilizar radicales libres donando electrones o átomos de hidrógeno (Bors & Saran, 1987).

En la industria los compuestos fenólicos han sido utilizados en los últimos años como antioxidantes naturales de 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 lipooxigenasa) (Cook & Samman, 1996).

2.6.1.2. Actividad antioxidante de las catequinas

En la Tabla 8 se puede apreciar la estructura y actividad antioxidante de las principales catequinas.



Tabla 8. Estructura y actividad antioxidante de las principales catequinas.

Nombre	Estructura	Actividad antioxidante reportada	Referencias Bibliográficas
(+)-catequina		Presenta actividad estabilizadora del radical hidroxilo, peróxido, superóxido y DPPH [•] . De igual forma se ha reportado que actúa como quelante de hierro.	Morel <i>et al.</i> , 1993; Scott, Butler, Halliwell & Aruoma, 1993; Fukumoto & Mazza, 2000; Yilmaz, 2006.
(-)-epicatequina		Al igual que la (+)-catequina, la (-)-epicatequina estabiliza radicales hidroxilo, peróxido, superóxido y DPPH [•] .	Bors & Michel, 1999; Fukumoto & Mazza, 2000; Liu, Ma, Zhou, Yang & Liu, 2000.
(-)-epigallocatequina		Estabiliza al radical DPPH [•] , inhibe lipoperoxidación.	Yilmaz, 2006.
(-)-galato de epigallocatequina		Son más efectivos que la (-)-epicatequina y la (+)-catequina en llevar a cabo la estabilización de radicales en la peroxidación lipídica. Poseen actividad antimicrobiana (contra <i>H. pylori</i>).	Shahidi & Alexander, 1998; Yanagawa, Yamamoto, Hara & Shimamura, 2003.
(-)-galato de epicatequina			



2.6.2. Determinación de la actividad antioxidante

2.6.2.1. Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Según Clarkson, (1995), en la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* (Tabla 9) para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presentan diferentes variaciones que pueden dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro.

Tabla 9. Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modelo de reacción ET y HAT.

Ensayo	Categoría
Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS ^{•+})	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH [•])	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de ruptura de radicales (TRAP)	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	



Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías (Huang, Ou & Prior, 2005):

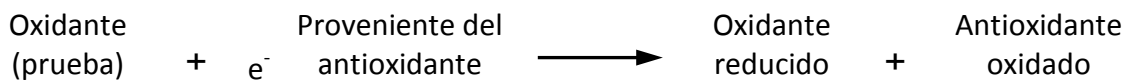
- 1) Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).
- 2) Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET).

Los ensayos basados en ET involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra; en la Figura 15 se muestran las reacciones específicas para los ensayos basados en la transferencia de electrones y en la transferencia de átomos de hidrógeno (Huang *et al.*, 2005).

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH[•] es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS^{•+} se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam, Bristi & Rafiqzaman, 2012). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.



Ensayos ET



Ensayos HAT

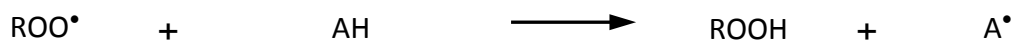


Figura 15. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno.

2.6.2.2. Ensayo DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH[•] para aceptar un átomo de hidrógeno (R-H) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta típico del radical, el cual absorbe en solución metanólica a $\lambda = 517 \text{ nm}$. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la Figura 16 (Alam *et al.*, 2012), el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado en la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH[•] ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha



revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Mishra, Ojha & Chaudhury, 2012).

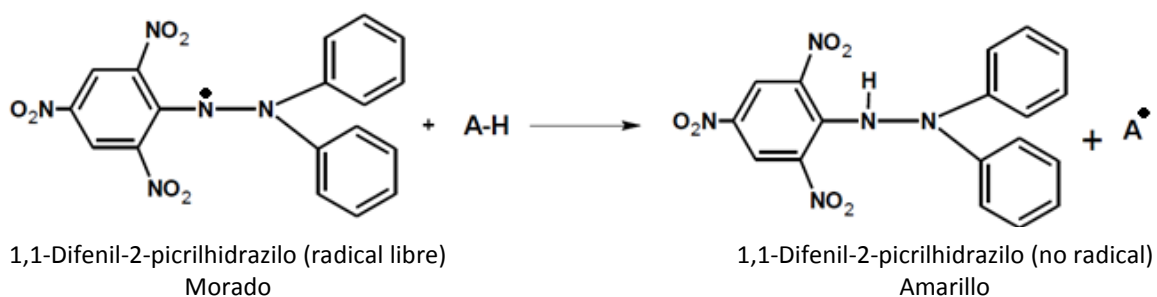


Figura 16. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

Los resultados del ensayo DPPH[•] se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC₅₀ cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH[•] usado (Deng, Cheng & Yang, 2011).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH[•] es un radical de nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo,



reaccionan lentamente o son inertes al DPPH[•]. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar la IC₅₀ que van en un rango de 1.15 min (Acido ascórbico) a 103 min (Rutina).

- La reacción cinética entre el DPPH[•] y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH[•], por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC₅₀.
- La reacción de DPPH[•] con eugenol es reversible (Bondet, Brand-Williams & Berset, 1997), lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

2.6.2.3. Ensayo ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)

La generación del catión radical ABTS^{•+} constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual, el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re *et al.*, 1999).

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS^{•+}, implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645



ANTECEDENTES



nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS como se muestra en la Figura 17 (Zuleta, Esteve & Frigola, 2009). De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{\bullet+}$ está determinado en función de la concentración y del tiempo, así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

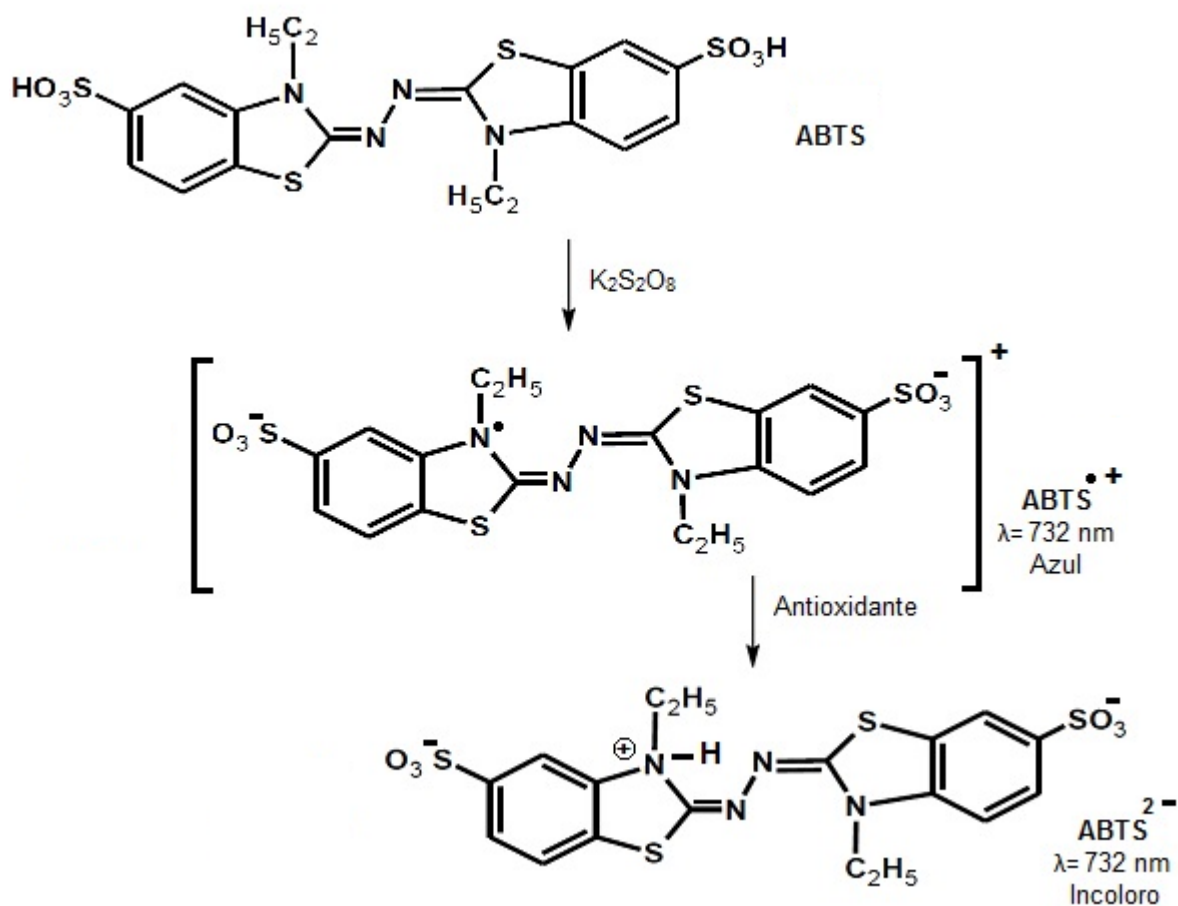


Figura 17. Estructura del $ABTS^{\bullet+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante.



3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas siempre han sido de vital importancia para el hombre, supliendo necesidades básicas como alimento y medicamento. Por tal razón, se han estudiado desde hace muchos años, demostrando sus grandes efectos biológicos en la salud humana; ya sea como reguladores, inhibidores enzimáticos, conservantes, entre otros (Raskyn *et al.*, 2002).

Estudios recientes indican la implicación crucial del estrés oxidativo, causado por el desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y la producción de especies oxidantes en varias etapas de la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, además del cáncer, problemas cardiovasculares y desordenes inflamatorios (Migliore & Coppdè, 2009).

El ser humano necesita radicales libres para realizar procesos biológicos como lo es el transporte de electrones, la regulación de la presión sanguínea, el control de las infecciones (Mosquera, Niño, Correa & Buitrago, 2005); sin embargo, la acumulación excesiva de estos agentes en el organismo puede provocar daños en las células, originando degeneración de los tejidos, lo que conlleva al desarrollo de diferentes enfermedades.

La manera más efectiva de evitar el daño producido por dichos radicales es su destrucción o estabilización por parte de antioxidantes (López y Echeverri, 2007). Debido a esto en los últimos años, el estrés oxidativo y sus efectos adversos en la salud humana ha llegado a ser un tema de alto interés en los campos biológico, medicinal, nutricional y agroquímico (Magalhães, Santos, Segundo, Reis & Lima, 2010); adicionalmente, la búsqueda y obtención de antioxidantes como



JUSTIFICACIÓN



alternativas de origen natural para sustituir a los antioxidantes sintéticos debido a sus efectos nocivos para el hombre y el medio ambiente.

En México existe una gran diversidad de plantas pertenecientes a diferentes familias, las cuales, pueden ser muy útiles como fuente de antioxidantes naturales. Esto es muy importante, ya que estos estudios pueden revelar cuáles son las especies vegetales que aunque no se consuman habitualmente, tengan una cantidad importante de antioxidantes, y así permitir encontrar fuentes de aislamiento de estos compuestos; hecho que resulta de interés en la investigación y en la industria farmacéutica.

En la medicina tradicional el muérdago *Cladocolea loniceroides* ha sido utilizado principalmente para tratar ECV (Rodríguez *et al.*, 2003), por estos motivos, el estudio de *Cladocolea loniceroides* se considera de importancia, ya que puede ser una valiosa fuente de obtención de compuestos de uso terapéutico o industrial por su gran abundancia.

Con base en lo anteriormente expuesto, éste proyecto se centrará en el estudio químico y la evaluación de la actividad antioxidante a partir del extracto metanólico de la especie *Cladocolea loniceroides*.



4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

- Aislar los compuestos mayoritarios del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* y determinar su actividad antioxidante.

4.2. ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre las propiedades medicinales y los compuestos aislados de *Cladocolea loniceroides*.
- Extraer las hojas de la especie *Cladocolea loniceroides* utilizando un método de maceración.
- Realizar el fraccionamiento del extracto utilizando métodos de partición y cromatográficos.
- Separar, purificar y caracterizar la estructura química de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto.
- Identificación de catequinas a través de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).
- Determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico a través de los métodos de captura de electrones DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y ABTS^{•+} (ácido 2-2'azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. MATERIAL Y EQUIPO

5.1.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Los análisis cualitativos de cromatografía en capa delgada (CCD) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio de 0.2 mm de grosor recubiertas con gel sílice (60 F₂₅₄ Merck[®], tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM de 0.25 mm de espesor) de diferentes dimensiones y diversos sistemas de elución. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta para tres longitudes de onda, (onda corta $\lambda = 254$ nm, onda media $\lambda = 302$ nm y onda larga $\lambda = 365$ nm) y posteriormente como agente cromógeno se empleó una solución de anisaldehído sulfúrico al 1% o vainillina sulfúrica al 1% indicados en la Tabla 10, seguido de calentamiento en parrilla eléctrica (aproximadamente 110 °C) hasta la visualización completa de los compuestos.

Tabla 10. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Reactivo	Composición	Referencia
Anisaldehído	9.0 mL de etanol 0.5 mL de anisaldehído 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado 1.0 mL de ácido acético	Wagner, Bladt & Zgainski, 1984.
Vainillina	0.5 mL de ácido sulfúrico en 9.5 mL de etanol (Solución 1) 0.1 g de vainillina en 10 mL de etanol (Solución 2)	Wagner <i>et al.</i> , 1984.



5.1.2. Cromatografía en capa delgada de tipo preparativo (CCDP)

Para la cromatografía en capa delgada de tipo preparativo (CCDP) se utilizaron placas de vidrio (20 x 20 cm) de 1 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck®).

5.1.3. Cromatografía en columna abierta (CCA)

En las cromatografías en columna abierta (CCA) se realizaron sobre sílica gel 60G y Sephadex LH-20 (Merck®) empacado en columnas de vidrio de diferentes dimensiones y utilizando diversas fases móviles.

5.1.4. Rotaevaporador

Se empleó rotaevaporador marca Büchi Heating Bath modelo, B-491, R-124 y RE-111 provisto de una bomba marca Büchi Vacuum Pump modelo V-710.

5.1.5. Espectrometría de masas

Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focussing System) por introducción directa a 70 eV, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z).

5.1.6. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

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 de protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 100 MHz) se realizaron en un equipo Varian® modelo VNMRS; se utilizaron metanol deuterado (CD₃OD) y dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) se



expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno.

5.1.7. Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS)

El análisis de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS), se realizó en un espectrómetro de masas modelo Synapt GS-2, marca WATERS, con tiempo de vuelo, acoplado con un cromatógrafo de líquidos modelo ACQUITY, marca WATERS. Los análisis se realizaron en una columna ACQUITY BEH, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 1.7 μm , dimensiones: 2.1 x 100 mm. El volumen de inyección fue de 3 μL previamente filtrados con un prefiltro de 0.45 micras. La elución se realizó utilizando un sistema isocrático 60 A : 40 B a un flujo de 0.3 mL/min; la fase móvil consistió de una mezcla binaria de Agua Mill Q (0.1% HCOOH; A) y CH₃CN (0.1% HCOOH; B). El método de ionización fue por electrospray por el mecanismo de protonación empleando las siguientes condiciones; temperatura de la cámara de ionización 100 °C, voltaje del capilar 3.00 kV, analizador tiempo de vuelo, detección de iones positivos y resolución: 20000.

Los análisis se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

5.1.8. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector de UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un



desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution.

La detección de catequinas se realizó en una columna XBridge C₁₈ marca Waters, con un tamaño de partícula de 5 μm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno).

El volumen de inyección fue de 10 μL. La elución se realizó con una mezcla ternaria de H₂O:MeOH:H₃PO₄ en una proporción de 946.5:50:3.5. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y la temperatura empleada para dicho análisis fue de 25°C. Las longitudes de onda empleadas para la detección de (-)-epicatequina y (+)-catequina en el extracto metanólico de *Cladoclea loniceroides* fueron de λ= 254 nm y λ= 278 nm.

5.1.9. Pruebas de antioxidantes

Para las pruebas de antioxidantes se emplearon, radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH[•]) con pureza del 99.9%, ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromen-2-carboxílico (Trolox), ácido gálico y ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), todos marca Sigma-Aldrich[®]; reactivo de Folin–Ciocalteu, hidróxido de sodio y el control positivo hidroquinona, éstos últimos Merck[®].

Para pesar se utilizó una balanza analítica Sartorius ED y Ohaus Adventure (New Jersey, USA); para medir volúmenes se usaron micropipetas Eppendorf de presión, de 0-10, 10-100 y 100-1000 μL (Hamburgo, Alemania); el material de vidrio manipulado fue Schott-Duran[®] (Tirschenreuth, Alemania); el lector de microplacas usado fue un Bio-Rad Benchmark[®] (California, USA) y espectrofotómetro de UV-Vis Beckman[®] modelo DU-65 (California, USA).



5.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo Sigma-Aldrich[®]
- Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromen-2-carboxílico Sigma-Aldrich[®]
- Acetato de etilo grado técnico
- Acetonitrilo grado cromatográfico LiChrosolv[®]
- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) Sigma-Aldrich[®]
- Ácido acético glacial J. T. Baker[®]
- Ácido acético grado técnico
- Ácido fórmico grado cromatográfico LiChrosolv[®]
- Ácido fosfórico grado cromatográfico LiChrosolv[®]
- Ácido gálico Sigma-Aldrich[®]
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido sulfúrico grado técnico
- Agua desionizada y destilada
- Agua grado cromatográfico (Sistema Mili-Q)
- Anisaldehído
- Cloruro de metileno grado técnico
- Diclorometano grado técnico
- Dimetil sulfóxido deuterado
- Etanol grado técnico
- Estándar de (+)-catequina Sigma-Aldrich[®]
- Estándar de (-)-epicatequina Sigma-Aldrich[®]
- Folin–Ciocalteu Merck[®]
- Hexano grado técnico
- Hidroquinona Merck[®]
- Hidróxido de sodio Merck[®]
- Metanol deuterado



- Metanol grado cromatográfico LiChrosolv®
- Metanol grado técnico
- Persulfato de potasio
- Sulfato de sodio anhidro
- Tetrametilsilano
- Vainillina

5.3. MATERIAL VEGETAL

La planta fructificada de la especie hemiparásita *Cladocolea loniceroides* utilizada en el presente estudio, fue recolectada en México, Distrito Federal, en la Delegación Coyoacán, dentro del campus Ciudad Universitaria, durante el mes de agosto del 2012; obtenida de árboles *Populus alba*, mejor conocidos como árboles "álamo blanco o chopo blanco"; la especie de muérdago fue identificada por el M. en C. y académico Bonifacio Don Juan Macías del Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Laboratorio 111 del edificio E de Farmacia, Facultad de Química, lugar de recinto del proyecto. El color característico del estado maduro de *Cladocolea loniceroides*, periodo clave del cual se realizó la recolecta, se observa a detalle en la Figura 18.



Figura 18. Fotografía de *Cladocolea loniceroides* empleada.



Se llevó a cabo la distinción visual para reconocer un *Populus alba* sano de uno parasitado como se muestra en la Figura 19.

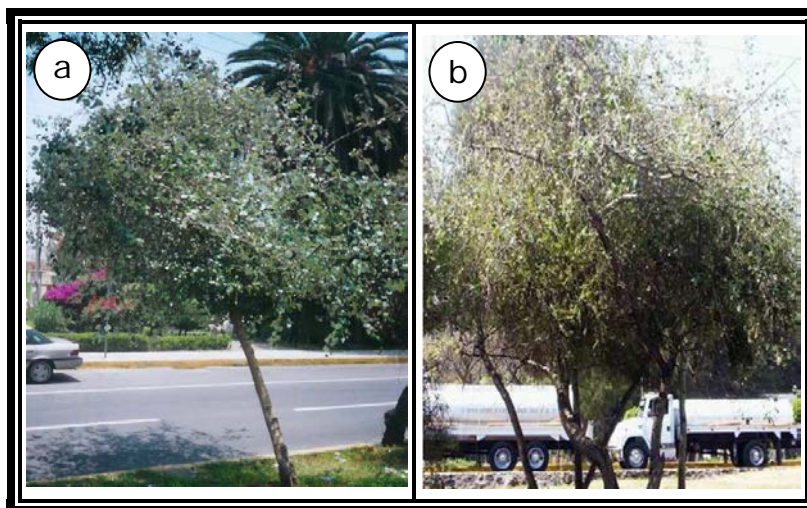


Figura 19. a. álamo blanco sano. b. álamo blanco enfermo.

Datos de los árboles de donde se obtuvo la planta en estudio (Figura 20):

- Especie hospedera: *Populus alba*
- Nombre común: Álamo blanco
- Altura: 3.5 m
- Diámetro a la altura del pecho: 20 cm
- Forma del fuste: recto
- Forma de la copa: deformada por presencia de muérdago



Figura 20. Árbol álamo blanco de donde se realizó la recolección de *Cladocolea loniceroides*.

5.4. EXTRACCIÓN

4.7 kg del material vegetal (partes aéreas de *Cladocolea loniceroides*) fue separado en hojas, tallos y frutos; el extracto se preparó a partir de 3.06 kg de hojas del material crudo, éstas hojas fueron sometidas a secado a temperatura ambiente sobre papel de estraza por aireación, el



peso final reflejó una pérdida de humedad de 62%, por lo que las hojas secas pesaron 1.22 kg.

El material seco fue molido empleando un molino tipo Willey modelo 4, el material resultante se almacenó como droga vegetal sometiendo a un proceso de maceración con metanol por un periodo de 72 h. Posteriormente, el material vegetal se separó por filtración y el extracto resultante se concentró al vacío. Como resultado de éste proceso se obtuvo 710 g de un extracto viscoso de color verde oscuro.

Este extracto fue sometido a un fraccionamiento primario preliminar mediante particiones sucesivas utilizando MeOH y AcOEt, el disolvente conteniendo el extracto fue recuperado mediante evaporación a presión reducida, repitiendo dicho ciclo cinco veces. En el Diagrama 1 se sintetiza el proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides*.

5.5. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE CL-1

50 g de la fracción primaria CL-1 fueron adsorbidos en 50 g de gel de sílice 60G siendo suspendidos con cloruro de metileno evitando la formación excesiva de grumos y se permitió su secado durante la noche. La fracción adsorbida se homogeneizó con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino color café.

En CCA de vidrio se colocó un filtro de gasa y algodón, seguido de un sello de 5 g de sulfato de sodio anhidro y 150 g de sílica gel 60G suspendidos en hexano. Se aplicó el extracto adsorbido previamente homogeneizado y se selló con sulfato de sodio. La elución se efectuó con hexano, hexano-CH₂Cl₂ (diversas proporciones de polaridad creciente), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (diversas proporciones de polaridad creciente) y MeOH; se monitoreó el fraccionamiento con CCD y se juntaron las

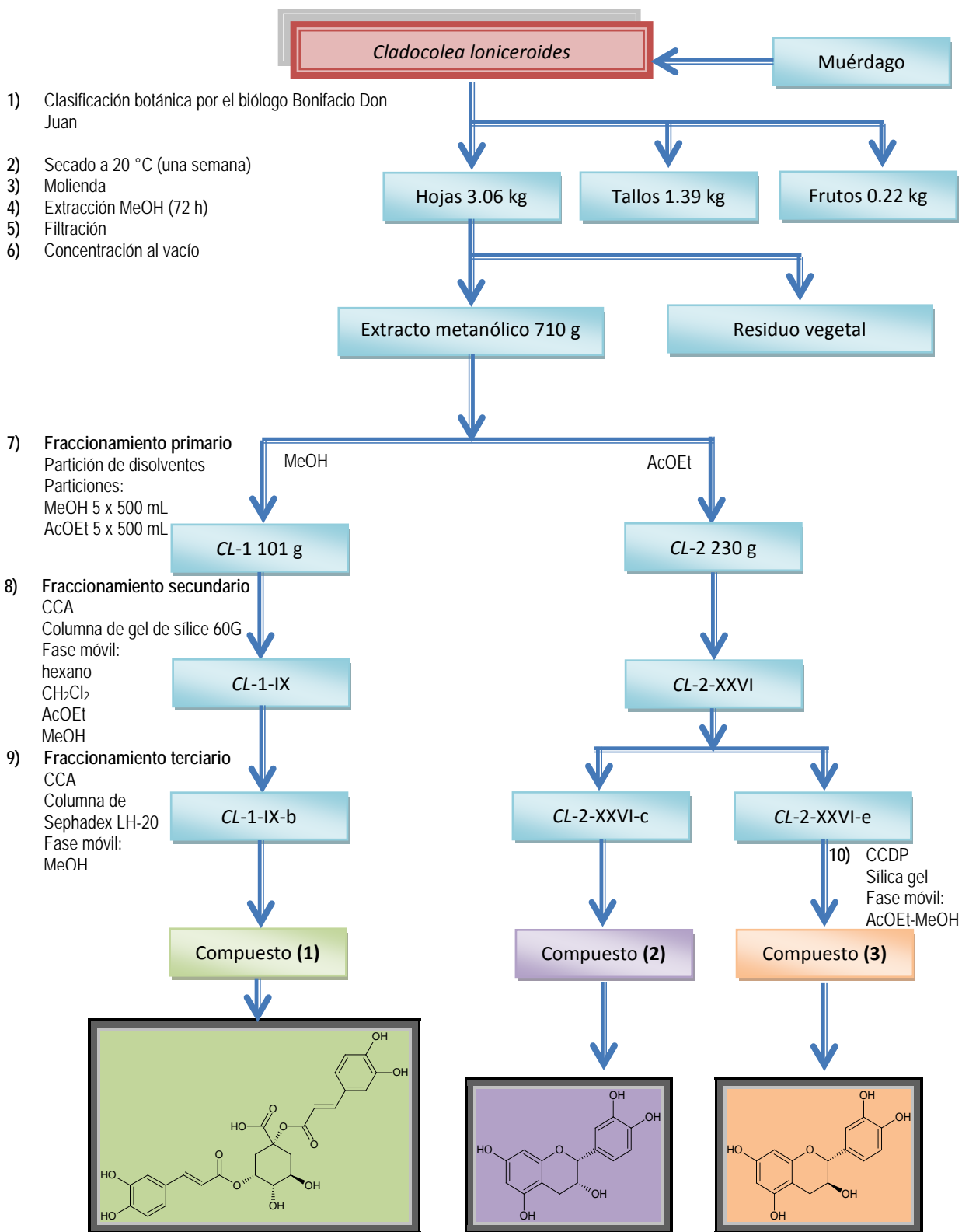


Diagrama 2. Proceso de extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de *Cladocolea loniceroides*.



fracciones con contenido químico de factor de retención (R_f) similar como se resume en la Tabla 11. Éste procedimiento generó 274 fracciones de 50 mL cada una, obteniéndose 9 conjuntos de fracciones secundarias.

Tabla 11. Fraccionamiento secundario de la fracción *CL-1* por cromatografía en columna abierta de gel de sílice 60G obtenida a partir del extracto de las hojas de *C. Ioniceroides*.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
hexano	100	1-13		
hexano-CH ₂ Cl ₂	90:10	14-27	1-31	<i>CL-1-I</i>
	85:15	28-40		
	70:30	41-53		
	60:40	54-66	32-62	<i>CL-1-II</i>
	50:50	67-79	63-93	<i>CL-1-III</i>
	40:60	80-92		
	30:70	93-105		
	20:80	106-118		
10:90	119-131	94-124	<i>CL-1-IV</i>	
CH ₂ Cl ₂	100	132-144	125-155	<i>CL-1-V</i>
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	145-157	156-186	<i>CL-1-VI</i>
	95:5	158-170		
	90:10	171-183	187-217	<i>CL-1-VII</i>
	80:20	184-196		
	70:30	197-209	218-248	<i>CL-1-VIII</i>
	60:40	210-222		
	50:50	223-235		
	40:60	236-248	249-274	<i>CL-1-IX</i>
30:70	249-261			
MeOH	100	262-274		

5.5.1. Fraccionamiento de *CL-1-IX*

La fracción secundaria *CL-1-IX* (3.5 g, Tabla 11) se separó por CCA empacada con 30.0 g de Sephadex LH-20 y empleando como eluyente MeOH. Este proceso generó un total de 90 fracciones de 25 mL cada una, las cuales se combinaron por su similitud cromatográfica, obteniéndose 8 conjuntos de fracciones terciarias. Éste proceso se resume en la Tabla 12.



Tabla 12. Fraccionamiento terciario de la fracción *CL-1-IX* por cromatografía en columna abierta de Sephadex H-20.

Eluyente	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
MeOH	90	1-12	<i>CL-1-IX-a</i>
		13-24	<i>CL-1-IX-b</i>
		25-36	<i>CL-1-IX-c</i>
		37-48	<i>CL-1-IX-d</i>
		49-60	<i>CL-1-IX-e</i>
		61-72	<i>CL-1-IX-f</i>
		73-84	<i>CL-1-IX-g</i>
		85-90	<i>CL-1-IX-h</i>

5.5.2. Identificación de la cinarina (1)

En la fracción *CL-1-IX-b* del fraccionamiento cromatográfico terciario se detectó un compuesto marrón que precipitó por el cambio de polaridad provocado al transferir las fracciones del matraz del rotaevaporador al frasco vial, con metanol y cloruro de metileno. El método de obtención se representa en la Figura 21.

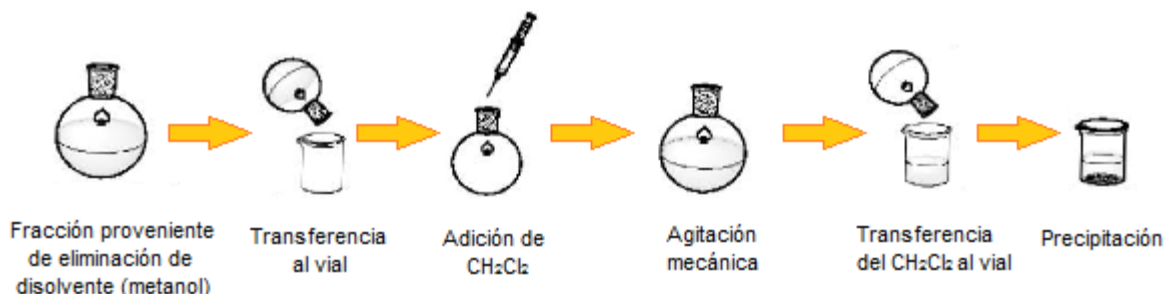


Figura 21. Obtención de cinarina por precipitación.

Debido a la pequeña cantidad obtenida de éste compuesto no se pudo caracterizar mediante RMN por lo que se analizó por el método de LC-MS, siguiendo la metodología del inciso 5.1.7. y mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos de la literatura se logró la identificación del compuesto como cinarina (**1**). Su estructura se muestra a continuación en la Figura 22.

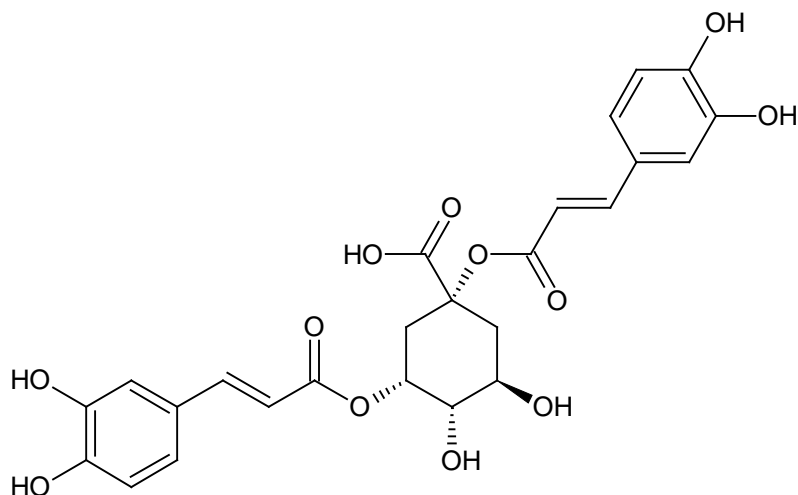


Figura 22. Estructura de la cinarina (1).

5.6. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE CL-2

115 g de la fracción primaria CL-2 fueron adsorbidos en 100 g de gel de sílice 60G siendo suspendidos con cloruro de metileno evitando la formación excesiva de grumos y se permitió su secado durante la noche. La fracción adsorbida se homogeneizó con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino color verde.

En una columna cromatográfica abierta de vidrio se colocó un filtro de gasa y algodón, seguido de un sello de 10 g de sulfato de sodio anhidro y 300 g de sílica gel 60G suspendidos en hexano. Se aplicó el extracto adsorbido previamente homogeneizado y se selló con sulfato de sodio. La elución se efectuó con hexano-AcOEt (diversas proporciones de polaridad creciente), AcOEt y AcOEt-MeOH (diversas proporciones de polaridad creciente); se monitoreó el fraccionamiento con CCD y se juntaron las fracciones con contenido químico de R_f similar como se resume en la Tabla 10. Éste procedimiento generó 200 fracciones de 100 mL cada una, obteniéndose 30 conjuntos de fracciones secundarias.

**Tabla 13.** Fraccionamiento secundario de la fracción *CL-2* por cromatografía en columna abierta de gel de sílice 60G obtenida a partir del extracto de las hojas de *C. Ioniceroides*.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
hexano-AcOEt	70:30	1-20	1-6	<i>CL-2-I</i>
	60:40	21-30	7-12	<i>CL-2-II</i>
			13-18	<i>CL-2-III</i>
	50:50	31-50	19-24	<i>CL-2-IV</i>
			25-30	<i>CL-2-V</i>
	40:60	51-70	31-36	<i>CL-2-VI</i>
			37-42	<i>CL-2-VII</i>
	30:70	71-90	43-48	<i>CL-2-VIII</i>
			49-54	<i>CL-2-IX</i>
	AcOEt	100	91-100	55-60
61-66				<i>CL-2-XI</i>
67-72				<i>CL-2-XII</i>
73-78				<i>CL-2-XIII</i>
79-84				<i>CL-2-XIV</i>
85-90				<i>CL-2-XV</i>
91-96				<i>CL-2-XVI</i>
97-102				<i>CL-2-XVII</i>
103-108				<i>CL-2-XVIII</i>
109-114				<i>CL-2-XIX</i>
AcOEt-MeOH	90:10	101-50	115-120	<i>CL-2-XX</i>
			121-124	<i>CL-2-XXI</i>
			125-130	<i>CL-2-XXII</i>
			131-139	<i>CL-2-XXIII</i>
			140-148	<i>CL-2-XXIV</i>
	50:50	151-200	149-157	<i>CL-2-XXV</i>
			158-166	<i>CL-2-XXVI</i>
			167-175	<i>CL-2-XXVII</i>
			176-184	<i>CL-2-XXVIII</i>
			185-193	<i>CL-2-XXIX</i>
			194-200	<i>CL-2-XXX</i>

5.6.1. Fraccionamiento de *CL-2-XXVI*

La fracción secundaria *CL-2-XXVI* (8 g, Tabla 13) fue recromatografiada utilizando una columna abierta empacada con 60.0 g de Sephadex LH-20 y empleando como eluyente MeOH. Este proceso generó un total de 220 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se combinaron por su similitud cromatográfica, obteniéndose 27 conjuntos de fracciones terciarias. Éste proceso se resume en la Tabla 14.



Tabla 14. Fraccionamiento terciario de la fracción *CL-2-XXVI* por cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20.

Eluyente	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
MeOH	220	1-8	<i>CL-2-XXVI-a</i>
		9-16	<i>CL-2-XXVI-b</i>
		17-24	<i>CL-2-XXVI-c</i>
		25-32	<i>CL-2-XXVI-d</i>
		33-40	<i>CL-2-XXVI-e</i>
		41-48	<i>CL-2-XXVI-f</i>
		49-56	<i>CL-2-XXVI-g</i>
		57-64	<i>CL-2-XXVI-h</i>
		65-72	<i>CL-2-XXVI-i</i>
		73-80	<i>CL-2-XXVI-j</i>
		81-88	<i>CL-2-XXVI-k</i>
		89-96	<i>CL-2-XXVI-l</i>
		97-104	<i>CL-2-XXVI-m</i>
		105-112	<i>CL-2-XXVI-n</i>
		113-120	<i>CL-2-XXVI-ñ</i>
		121-128	<i>CL-2-XXVI-o</i>
		129-136	<i>CL-2-XXVI-p</i>
		137-144	<i>CL-2-XXVI-q</i>
		145-152	<i>CL-2-XXVI-r</i>
		153-160	<i>CL-2-XXVI-s</i>
		161-168	<i>CL-2-XXVI-t</i>
		169-176	<i>CL-2-XXVI-u</i>
177-184	<i>CL-2-XXVI-v</i>		
185-192	<i>CL-2-XXVI-w</i>		
193-200	<i>CL-2-XXVI-x</i>		
201-208	<i>CL-2-XXVI-y</i>		
209-220	<i>CL-2-XXVI-z</i>		

5.6.2. Aislamiento de (-)-epicatequina (2)

En la fracción *CL-2-XXVI-c* del fraccionamiento cromatográfico terciario se detectó un compuesto color blanco cristalino que precipitó de manera espontánea, mostró pureza cromatográfica por medio de CCD y se corroboró su estructura como (-)-epicatequina (**2**) mediante técnicas espectroscópicas RMN ^1H y ^{13}C . Su estructura se muestra a continuación (Figura 23).

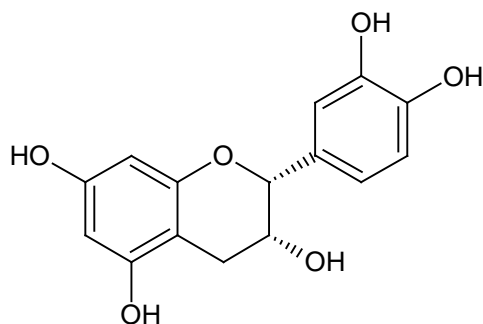


Figura 23. Estructura de la (-)-epicatequina **(2)**.

5.6.3. Aislamiento de (+)-catequina **(3)**

En la fracción *CL-2-XXVI-e* del fraccionamiento cromatográfico terciario se detectó un compuesto puro por CCD, por lo que se procedió a purificar el compuesto por CCDP utilizando AcOEt-MeOH (7:3) como sistema de elución. Éste proceso permitió el aislamiento de un sólido amorfo color marfil, el cual se identificó mediante espectroscopía RMN ^1H y ^{13}C como (+)-catequina **(3)**. Su estructura se muestra a continuación (Figura 24).

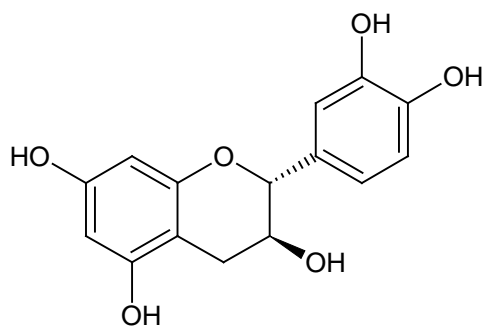


Figura 24. Estructura de la (+)-catequina **(3)**.

5.5.4. Identificación de catequinas por HPLC

Para corroborar la presencia de la (-)-epicatequina y la (+)-catequina se realizó un análisis por HPLC del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* ya que éstas moléculas son muy similares, para ello se preparó una disolución de 40 mg/mL del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* y disoluciones de 200 $\mu\text{g/mL}$ de los estándares



de (-)-epicatequina y (+)-catequina Sigma-Aldrich®. Se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado 5.1.8.

5.7. PRUEBAS DE ANTIOXIDANTES

5.7.1. Preparación de las muestras

La preparación de la muestra (extracto metanólico de las hojas de *Cladocolea loniceroides* a evaluar) se realizó según el procedimiento descrito en el Diagrama 3 para el ensayo de la determinación de la capacidad antioxidante (DPPH• y ABTS•+).

La disolución del extracto vegetal en metanol se realizó por medio del sistema metanol-agua-etanol (6:2:2 v/v).

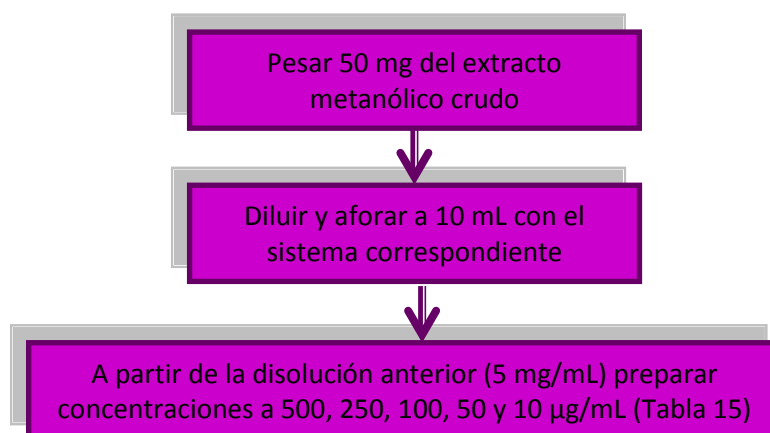


Diagrama 3. Protocolo para la preparación de la muestra.

A partir de la solución stock se tomaron las respectivas alícuotas, necesarias para preparar concentraciones de 500, 250, 50, 10 µg/mL del extracto, como se muestra en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Volúmenes de dilución a partir de la solución stock.

Vol. Solución stock (µL)	Vol. del aforo (mL)	Concentración final del extracto (µg/mL)
500	5	500
250	5	250
100	5	100
50	5	50
10	5	10

5.7.2. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH[•]

5.7.2.1. Preparación de la solución de DPPH[•]

Para cada ensayo se preparó en un matraz completamente cubierto de papel aluminio la solución del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH[•]) a 20 mg/L en metanol grado analítico y subsecuentemente se transfirió a un frasco ámbar cubierto con papel aluminio para evitar su rápida degradación.

5.7.2.2. Capacidad captadora del radical DPPH[•]

La determinación de la actividad antioxidante del extracto vegetal se llevó a cabo de acuerdo con el método Bondet *et al.*, (1997), con ligeras modificaciones como se describe en el Diagrama 3. Cada ensayo se realizó dos veces y a su vez cada muestra por triplicado.

Se realizó un tamizaje a una concentración de 1000 µg/mL para determinar la actividad antioxidante de cada extracto con el objetivo de descartar a aquel que a dicha concentración no presentaran un porcentaje de actividad antioxidante mayor o igual a 25% (%AAOx ≥ 25) y por tanto no se consideraban activos en este trabajo. Para esto se siguió el protocolo descrito en el Diagrama 4 (Murillo, Lombo, Tique y Méndez, 2007).

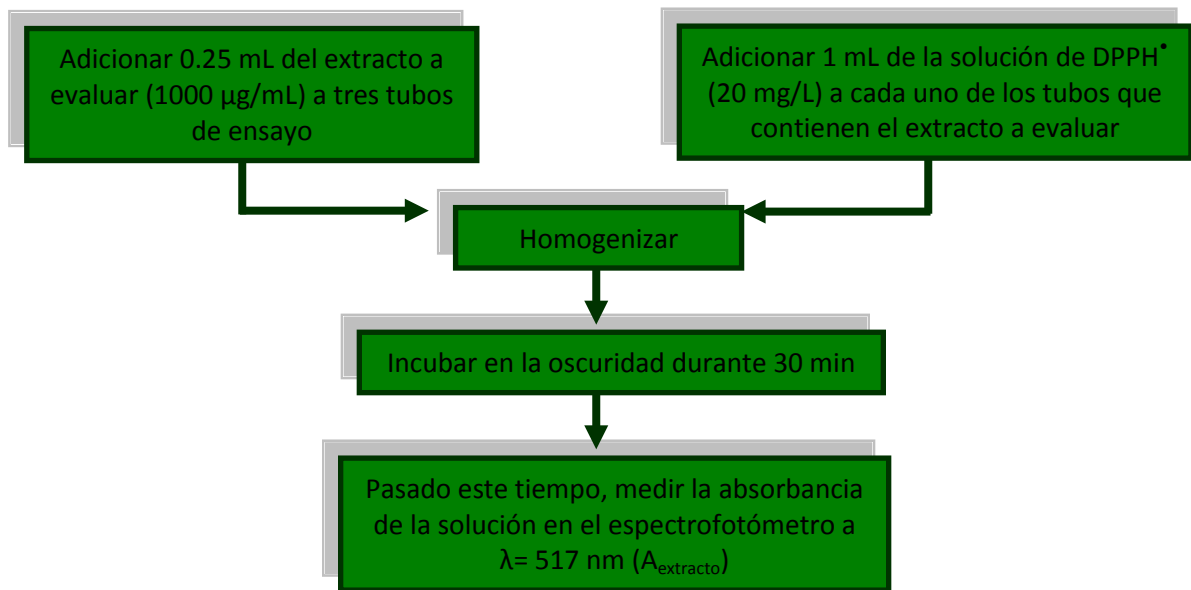


Diagrama 4. Método para evaluar actividad antioxidante por el método de DPPH*.

Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona a una concentración de 1000 µg/mL; como control negativo ($A_{\text{control}(-)}$) se tomó el sistema de disolución correspondiente; ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo usado para el extracto (Diagrama 4). Además se midió el control fotométrico preparado a partir de 1.25 mL de metanol para descartar la absorbancia de este solvente en las mediciones. El blanco del extracto fue preparado a partir de 0.25 mL del extracto en análisis y 1 mL de metanol, ésta solución fue medida a una $\lambda = 517 \text{ nm}$ ($A_{\text{blanco extracto}}$). A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el %AAOx con la ecuación que se presenta en la Figura 25 (Murillo *et al.*, 2007):

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{extracto}} - A_{\text{blanco extracto}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Figura 25. Ecuación para calcular el porcentaje de actividad antioxidante del extracto para el ensayo DPPH*.

Donde:



A_{extracto} : Absorbancia del extracto (muestra + DPPH).

$A_{\text{blanco extracto}}$: Absorbancia del blanco del extracto (muestra + metanol).

$A_{\text{control(-)}}$: Absorbancia del control negativo (DPPH + metanol).

Posterior al cálculo de los porcentajes de actividad antioxidante para cada una de las concentraciones, se determinó la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}) mediante un modelo de regresión.

5.7.2.3. Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox

La capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de la solución de Trolox que tiene la misma capacidad captadora de radicales libres que el extracto. Con el objeto de comparar los resultados de capacidad antioxidantes de los extracto vegetal que se obtuvo mediante los diferentes métodos (DPPH \bullet y ABTS \bullet^{+}) se realizó una curva estándar del antioxidante de referencia Trolox, con concentraciones desde 1 μM hasta 32 μM usando etanol absoluto como solvente. De allí, se obtuvo una ecuación de correlación con la cual se interpola su correspondiente valor en equivalentes Trolox según el %AAOx obtenido. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.7.3. Actividad inhibidora del catión radical ABTS \bullet^{+}

5.7.3.1. Generación de radical catión ABTS \bullet^{+}

La solución del radical catión ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS \bullet^{+}) solo es estable durante máximo dos días; por tal razón, se preparaban 5 mL de solución para cada ensayo y se ajustaba la absorbancia a 0.7 ± 0.02 diluyendo con etanol analítico a $\lambda = 732 \text{ nm}$. El protocolo para la preparación de la solución de ABTS \bullet^{+} se describe en el Diagrama 5 (Re *et al.*, 1999).

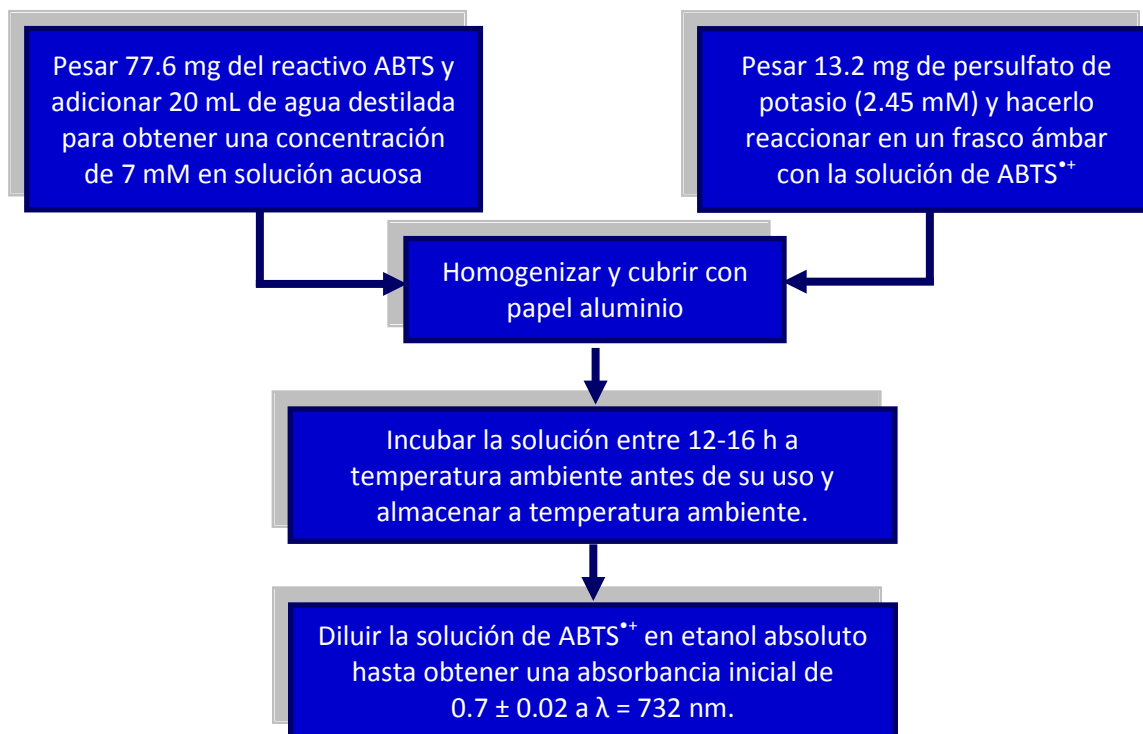


Diagrama 5. Protocolo para la generación del radical catión $ABTS^{*\cdot}$.

5.7.3.2. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método del $ABTS^{*\cdot}$

De acuerdo con lo planteado previamente, se analizó el extracto considerándolo como activo a un %AAOx ≥ 25 en concentración de 1000 mg/L en el ensayo del DPPH $^{\cdot}$ y se evaluaron a diferente concentración para la determinación posterior del IC₅₀ en el ensayo del $ABTS^{*\cdot}$. Cada ensayo se realizó dos veces y a su vez la muestra se evaluó por triplicado. (Ver tratamiento de la muestra en la Diagrama 3).

La actividad inhibidora del radical catión $ABTS^{*\cdot}$ sobre el extracto en estudio, se midió de acuerdo al método descrito (Re *et al.*, 1999; Mathew & Abraham, 2006) con algunas modificaciones referidas a las concentraciones en los extractos. Dichas modificaciones están incluidas en el procedimiento descrito en la Diagrama 6.

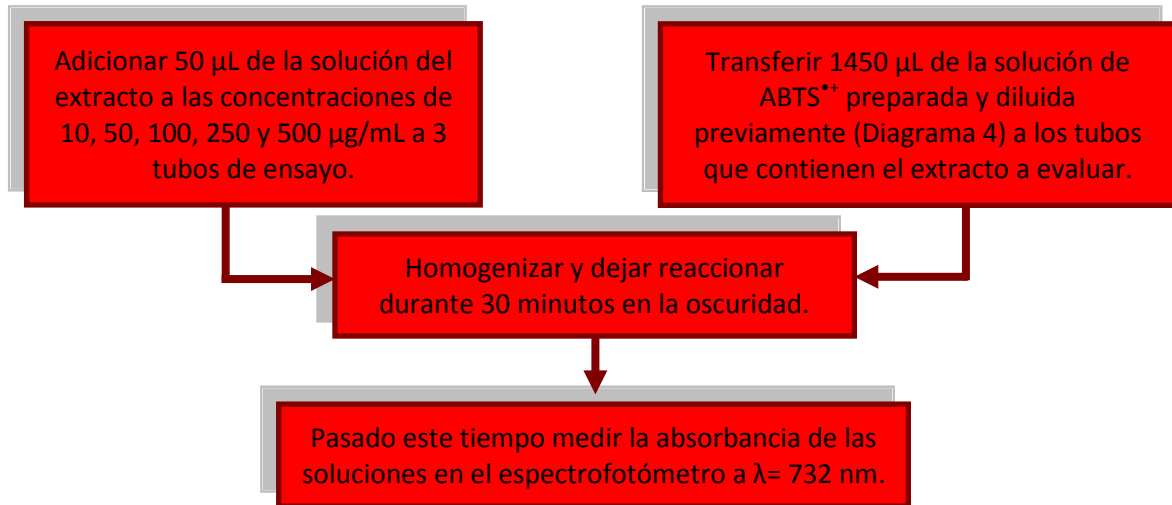


Diagrama 6. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+}.

Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona (1000 µg/mL), como control negativo ($A_{\text{control}(-)}$) se usó el sistema de disolución correspondiente. Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo utilizado en la medición del extracto. Adicional a esto, se midió el control fotométrico preparado a partir de 2 mL de EtOH-agua (1:1) para descartar la absorbancia del solvente en las mediciones.

El blanco del extracto se preparó a partir de 50 µL del extracto y 1450 µL de la mezcla de agua y etanol (1:2), ésta solución fue medida a una $\lambda = 732$ nm ($A_{\text{blanco extracto}}$).

La capacidad captadora de radicales libres (porcentaje de actividad antioxidante) se calculó mediante la misma ecuación por medio de la cual se halló en el ensayo DPPH[•] (ver Figura 25).

El IC₅₀ se halló de la misma manera que en el ensayo DPPH; a partir del %AAOx determinado y mediante regresión lineal. Los equivalentes Trolox se hallaron a partir de la curva estándar y del %AAOx obtenido para cada concentración del extracto vegetal.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se generaron en la investigación fue el estudio químico del extracto metanólico de la especie *Cladocolea loniceroides* en cuestión, aplicando distintas técnicas cromatográficas, que permitieron el aislamiento e identificación de los compuestos mayoritarios y adicionalmente éste extracto se sometió a pruebas de actividad antioxidante.

6.1. AISLAMIENTO DE COMPUESTOS

6.1.1. Cinarina

En la fracción *CL-1-IX* del fraccionamiento secundario cromatográfico proveniente de una CCA de gel de sílice 60G, empleando hexano, AcOEt y MeOH en diversas mezclas de polaridad creciente como eluyentes, se detectó un compuesto de interés debido a su color azul fluorescente en CCD visto en la lámpara de UV $\lambda = 365$ nm; debido a la constitución diversa de ésta fracción, se procedió a purificar por CCA empleando como fase estacionaria Sephadex LH-20 eluyendo con MeOH, como resultado de éste fraccionamiento terciario; en la fracción *CL-1-IX-b* se detectó un compuesto que precipitó por el cambio de polaridad provocado al transferir las fracciones del matraz del rotaevaporador al frasco vial (Figura 18), obteniendo así un compuesto sólido marrón (Figura 26), con punto de fusión de 225-227 °C (el punto de fusión se obtuvo en un equipo Fisher-Johns y no está corregido).

Dicho compuesto no se pudo estudiar mediante RMN debido a la pequeña cantidad obtenida, por ésta razón, el compuesto se analizó por LC-MS (Figura 27). Éste análisis permitió determinar para el compuesto **(1)** un T_r de 2.04 min; se apreció un pseudo ión molecular $[M+H]^+$ $m/z = 516.27$; un pico base $[M+H-1]^+$ $m/z = 515.26$ de pérdida de un



Figura 26. Fotografía del compuesto **(1)** y su respectiva CCD, a luz de UV $\lambda = 365$ nm.

protón, permitió observar un fragmento $m/z = 441.32$ que corresponde a descarboxilación y deshidratación del anillo de ciclohexano, de éste último, también una ruptura del anillo antes mencionado y pérdida de una molécula de etileno para generar un fragmento $m/z = 413.28$, y mediante la comparación de los espectros obtenidos con los de la literatura, se logró identificar al compuesto **(1)** como cinarina de fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$ y $516.45 \text{ g mol}^{-1}$ de peso molecular; en la Figura 28 se puede observar la estructura 3D de la molécula hallada.

La cinarina se encuentra en la categoría de los ácidos fenólicos que proporcionan acidez al fruto y derivan de la fenilalanina por vía de los ácidos cumárico y cinámico (Ozawa, Lilley & Haslam, 1987; Ferrer, 1997). El ácido 1,5-O-dicafeilquínico (cinarina) es una molécula perteneciente a los ácidos fenólicos, principio activo más destacable de la alcachofa, compuesto que ha demostrado efectividad en la prevención de ECV (Carretero, 2000; Coinu *et al.*, 2007; Fratianni, Tucci, De Palma, Pepe & Nazzaro, 2007). Estudios recientes como el de Fratianni *et al.*,

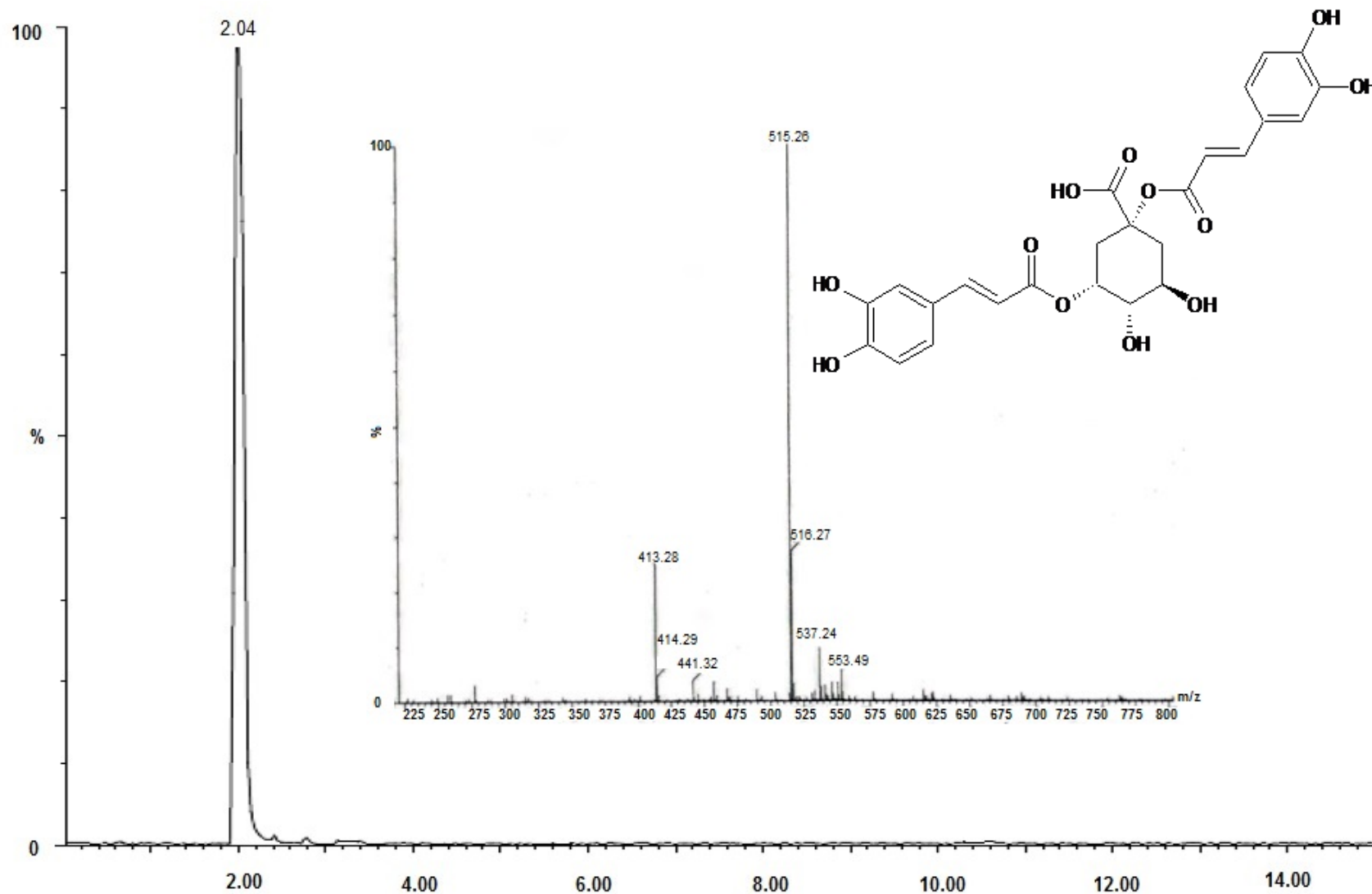


Figura 27. Análisis por el método de LC-MS de cinarina (1).



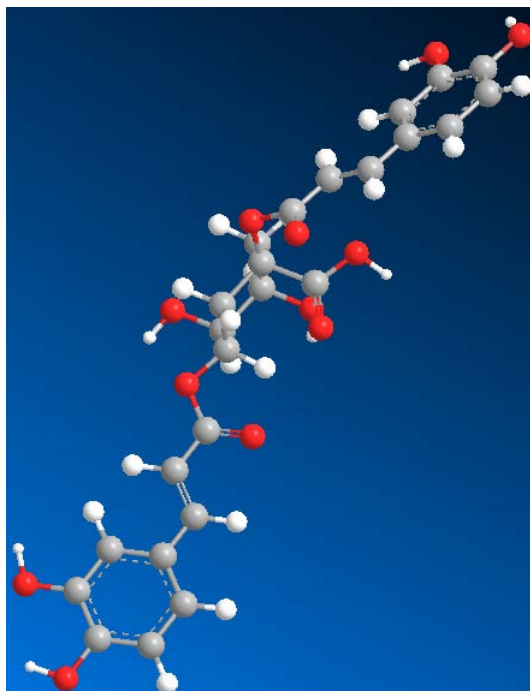


Figura 28. Modelo estructural en 3D de la cinarina, observando los átomos de carbono de color gris, los átomos de hidrógeno de color blanco y los átomos de oxígeno de color rojo.

demonstraron que los compuestos de la alcachofa como la cinarina poseen una importante actividad antioxidante.

6.1.2. (-)-epicatequina

Con el objetivo de aislar los compuestos mayoritarios del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* se estudió la fracción primaria CL-2, ésta fracción de mayor abundancia se sometió a una CCA provista de sílica gel 60G haciendo eluir con mezclas de los disolventes hexano, AcOEt y MeOH de acuerdo a una polaridad ascendente; en la fracción secundaria CL-2-XXVI se pudo observar la posible presencia de flavonoides por medio de monitoreos mediante CCD, esto debido a que el uso del agente cromogénico vainillina utilizado (Tabla 9) y calentamiento, reveló coloraciones de rojas a púrpura rojizas características de flavonoides; después de estas observaciones, se



prosiguió a realizar un fraccionamiento cromatográfico terciario usando CCA empacada con Sephadex LH-20 y empleando como eluyente MeOH, de ésta manera se obtuvo de la fracción *CL-2-XXVI-c*, un compuesto cristalino color blanco (Figura 29), con punto de fusión (p. f.) de 236-238 °C (el p.f. se obtuvo en un equipo Fisher-Johns y no esta corregido).

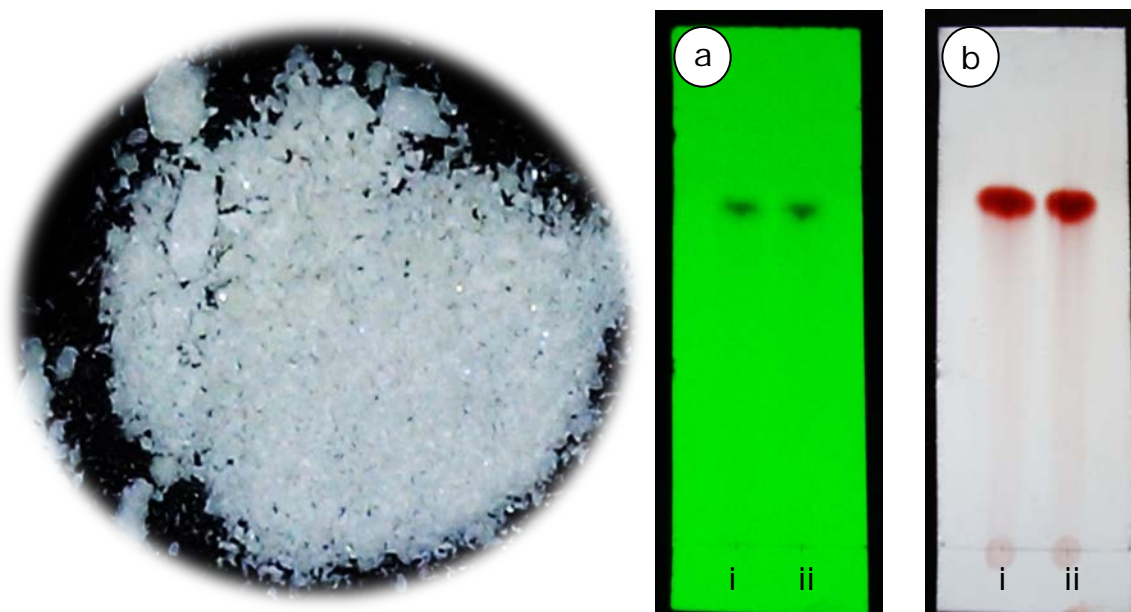


Figura 29. Fotografía del compuesto **(2)** y su respectiva CCD mostrando en la aplicación i el compuesto aislado y en ii el compuesto de Sigma-Aldrich®. a. cromatoplaaca a luz de UV $\lambda=254$ nm. b. cromatoplaaca con agente cromógeno vainillina sulfúrica y calentamiento.

Dicho compuesto fue analizado por RMN y se identificó como (-)-epicatequina **(2)** de fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ y $290.26 \text{ g mol}^{-1}$ de peso molecular, en la Figura 30 se puede observar la estructura 3D de la molécula hallada.

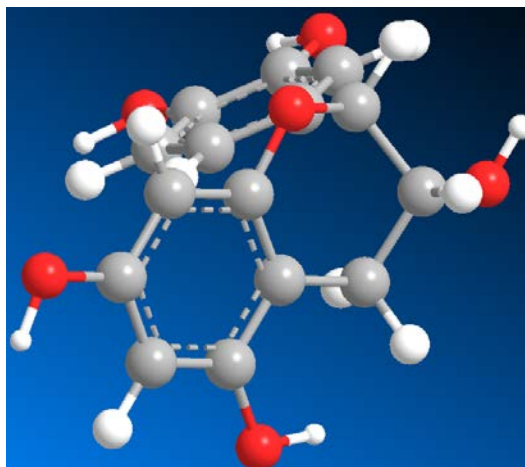


Figura 30. Modelo estructural en 3D de la (-)-epicatequina, observando los átomos de carbono de color gris, los átomos de hidrógeno de color blanco y los átomos de oxígeno de color rojo.

Los datos espectroscópicos del compuesto **(2)**, se muestran a continuación:

RMN-¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 6.98 (d, *J*= 2.0 H-2'), 6.79 (dd, *J*= 8.0, 2.0, H-6'), 6.75 (d, *J*= 8.0, H-5'), 5.94 (d, *J*= 4.0, H-8), 5.92 (d, *J*= 2.4, H-6), 4.88 (s, H-2), 4.86 (s, H-3), 2.86 (dd, *J*= 16.0, 4.0, H-4 α), 2.73 (dd, *J*= 20.0, 4.0, H-4 β). (Figura 31).

RMN-¹³C (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 156.6 (C-7), 156.2 (C-9), 155.9 (C-5), 144.5 (C-3'), 144.3 (C-4'), 130.9 (C-1'), 118.0 (C-6'), 114.5 (C-5'), 113.9 (C-2'), 98.7 (C-10), 95.0 (C-6), 94.5 (C-8), 78.5 (C-2), 66.1 (C-3), 27.8 (C-4). (Figura 32).

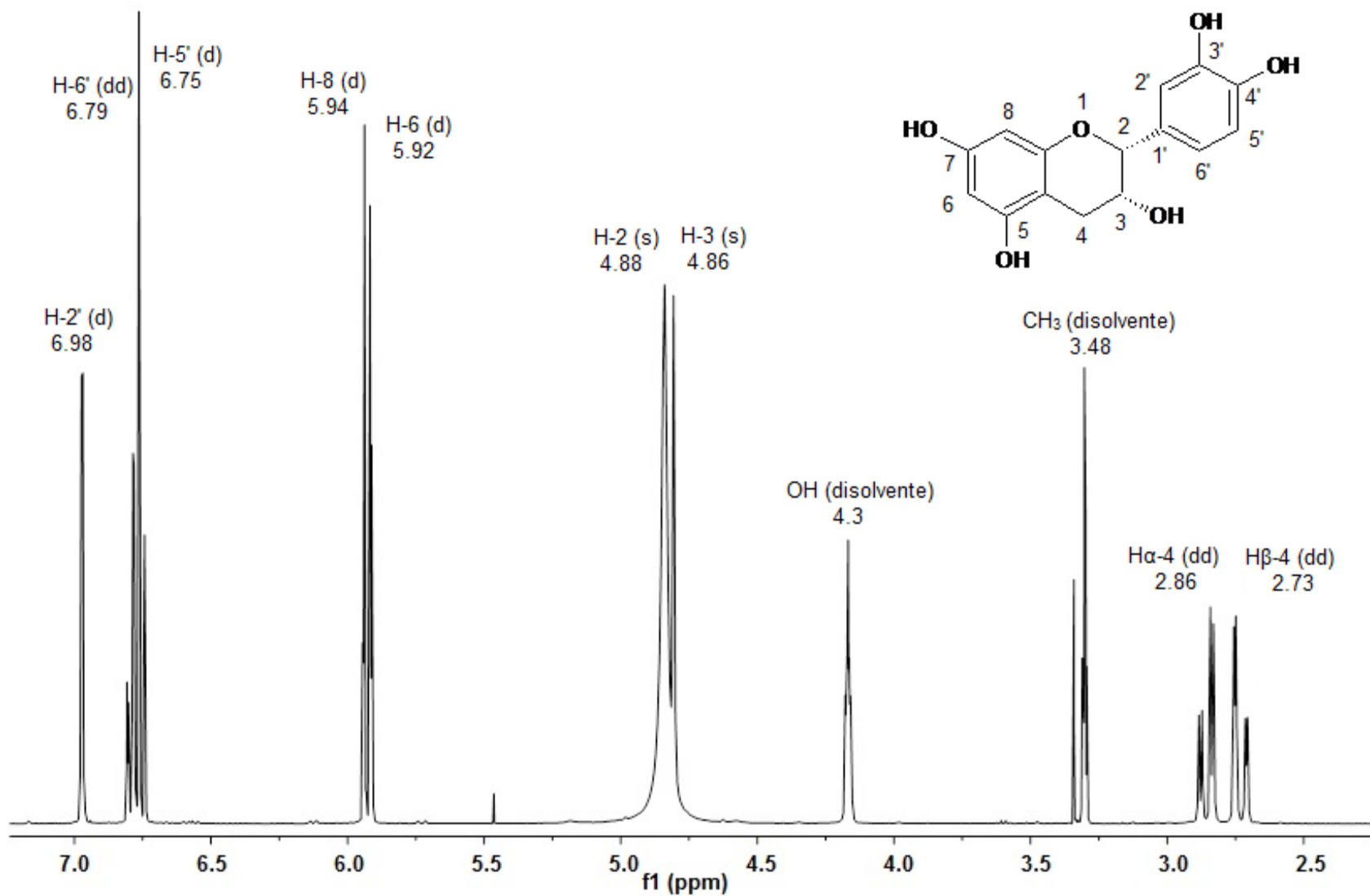


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H de (-)-epicatequina ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz).



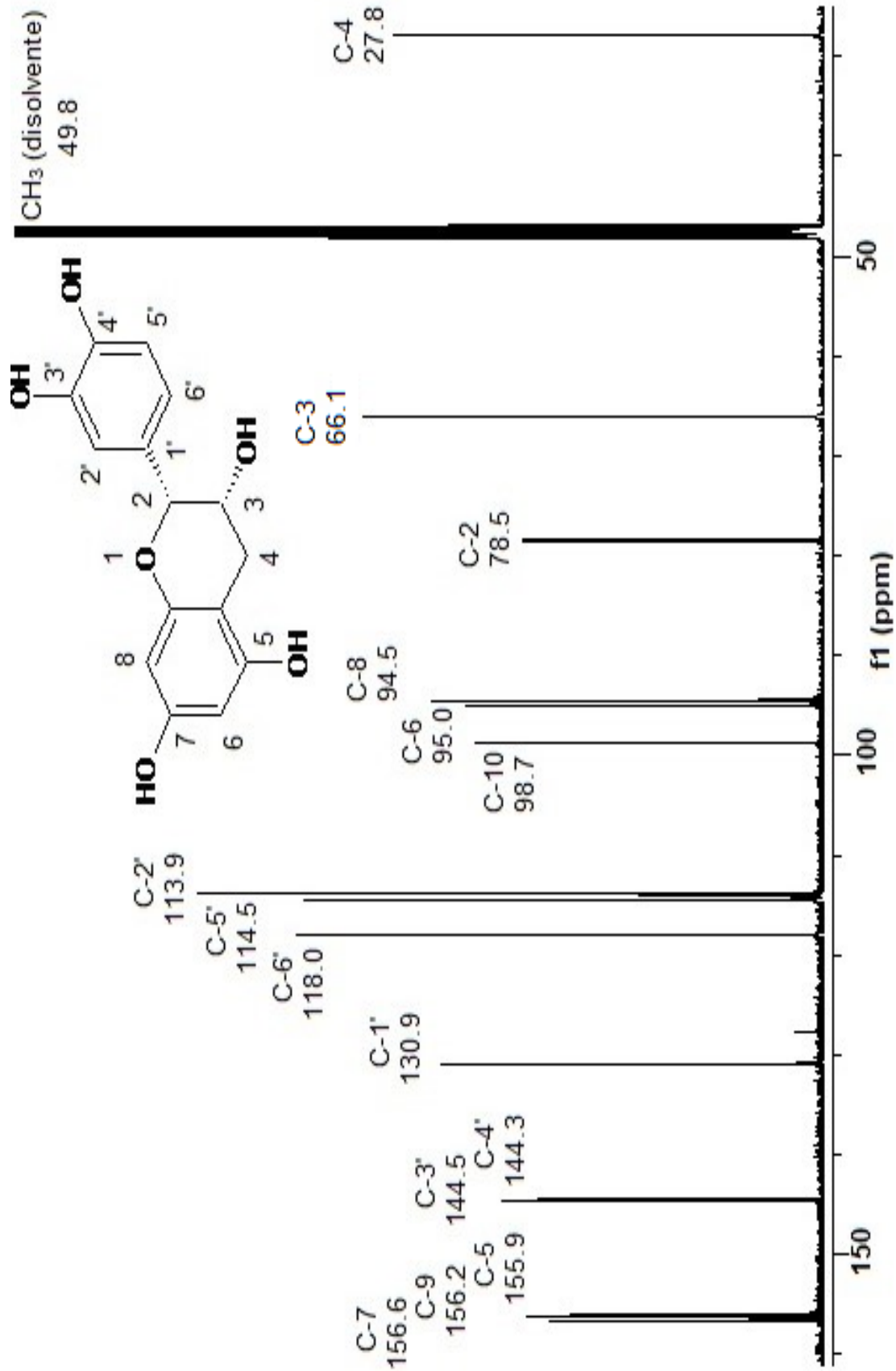


Figura 32. Espectro de RMN-¹³C de (-)-epicatequina (MeOH-*d*₄, 100 MHz).



6.1.1. (+)-catequina

Al igual que en el caso de la (-)-epicatequina, la (+)-catequina se aisló de la fracción primaria CL-2 del extracto metanólico de *Cladoclea loniceroides*, ésta fracción de considerable abundancia se sometió a una CCA provista de sílica gel 60G haciendo eluir con mezclas de los disolventes hexano, AcOEt y MeOH de polaridad creciente, en la fracción secundaria CL-2-XXVI se pudo observar la posible presencia de flavonoides por medio de monitoreos mediante CCD, esto debido a que el uso del agente cromogénico vainillina utilizado (Tabla 9) y calentamiento, reveló coloraciones rojizas. Después de estas observaciones, se prosiguió a realizar un fraccionamiento cromatográfico terciario usando CCA empacada con Sephadex LH-20 y empleando como eluyente MeOH, así se obtuvo de la fracción CL-2-XXVI-e, un sólido amorfo color marfil (Figura 33), con p.f. = 174-176 °C (el p.f. se obtuvo en un equipo Fisher-Johns no corregido).

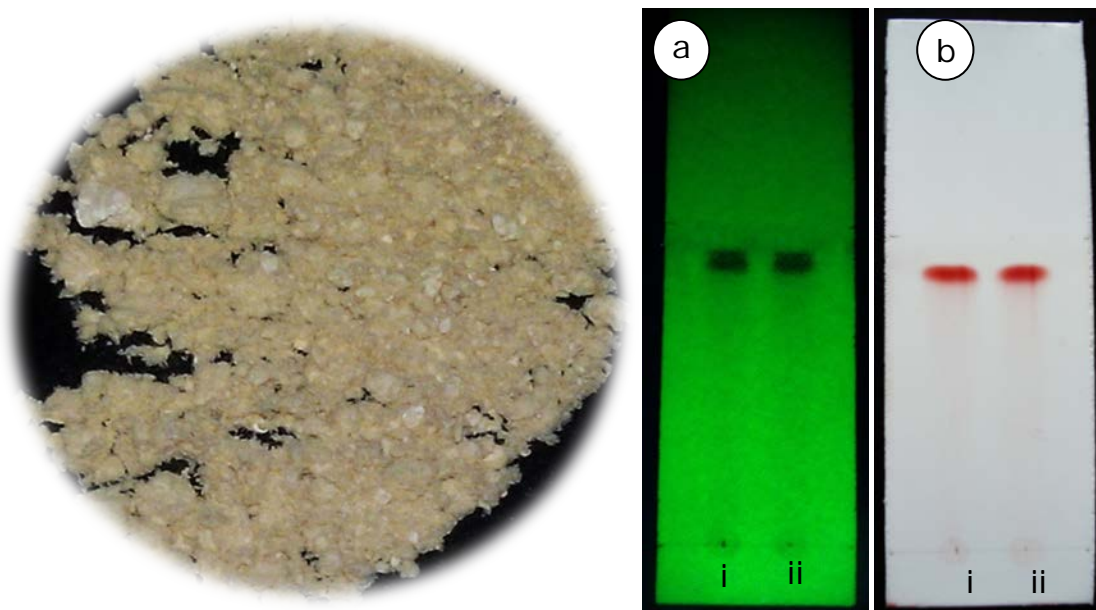


Figura 33. Fotografía del compuesto (**3**) y su respectiva CCD mostrando en la aplicación i el compuesto aislado y en ii el compuesto de Sigma-Aldrich®. a. cromatoplaa a luz de UV $\lambda=254$ nm. b. cromatoplaa con agente cromógeno vainillina sulfúrica y calentamiento.



Dicho compuesto fue analizado por RMN y se identificó como (+)-catequina (**3**), asignaciones comparadas con resultados de (+)-catequina obtenida del té verde (Davis, Cai, Davies & Lewis, 1996) de fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ y $290.26 \text{ g mol}^{-1}$ de peso molecular, en la Figura 34 se puede observar la estructura 3D de la molécula hallada.

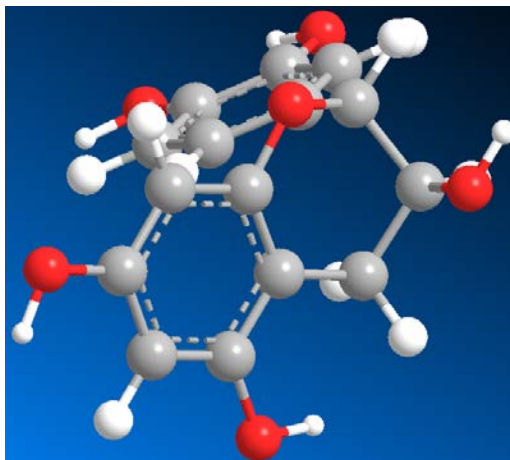


Figura 34. Modelo estructural en 3D de la (+)-catequina, observando los átomos de carbono de color gris, los átomos de hidrógeno de color blanco y los átomos de oxígeno de color rojo.

Los datos espectroscópicos del compuesto (**3**), se muestran a continuación:

RMN- ^1H (400 MHz, MeOH- d_4) δ (ppm): 6.82 (d, $J= 2.0$ H-2'), 6.76 (d, $J= 8.0$, H-6'), 6.72 (dd, $J= 8.0, 2.0$, H-5'), 5.92 (d, $J= 4.0$, H-8), 5.85 (d, $J= 2.0$, H-6), 4.56 (d, H-2), 3.97 (c, $J=4.0$, H-3), 2.85 (dd, $J= 16.0, 8.0$, H-4 α), 2.50 (dd, $J= 16.0, 8.0$, H-4 β). (Figura 35).

RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4) δ (ppm): 156.6 (C-7), 156.2 (C-9), 155.9 (C-5), 144.5 (C-3'), 144.3 (C-4'), 130.9 (C-1'), 118.0 (C-6'), 114.5 (C-5'), 113.9 (C-2'), 98.7 (C-10), 95.0 (C-6), 94.5 (C-8), 78.5 (C-2), 66.1 (C-3), 27.8 (C-4). (Figura 36).

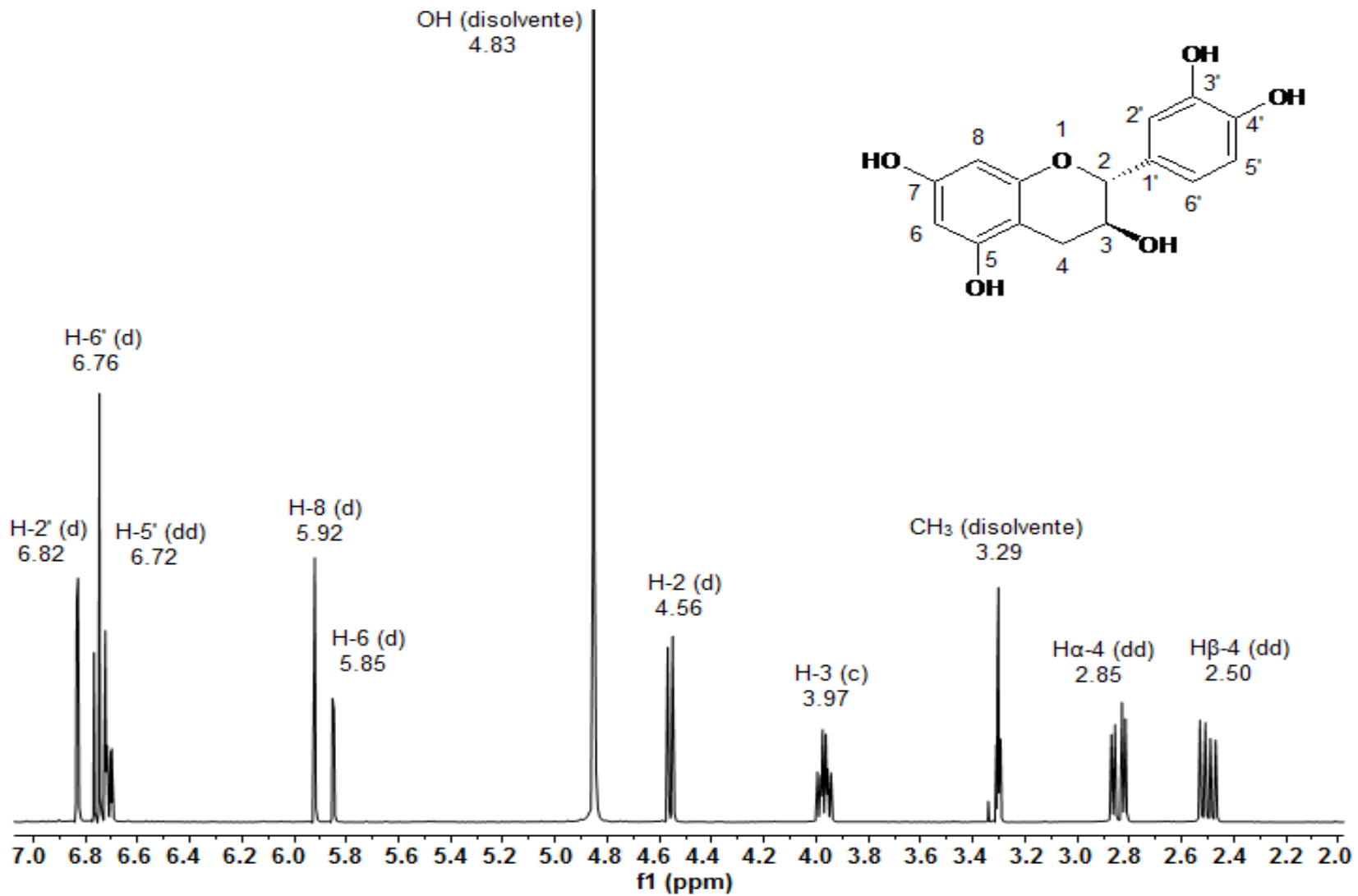


Figura 35. Espectro de RMN- ^1H de (+)-catequina ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz).



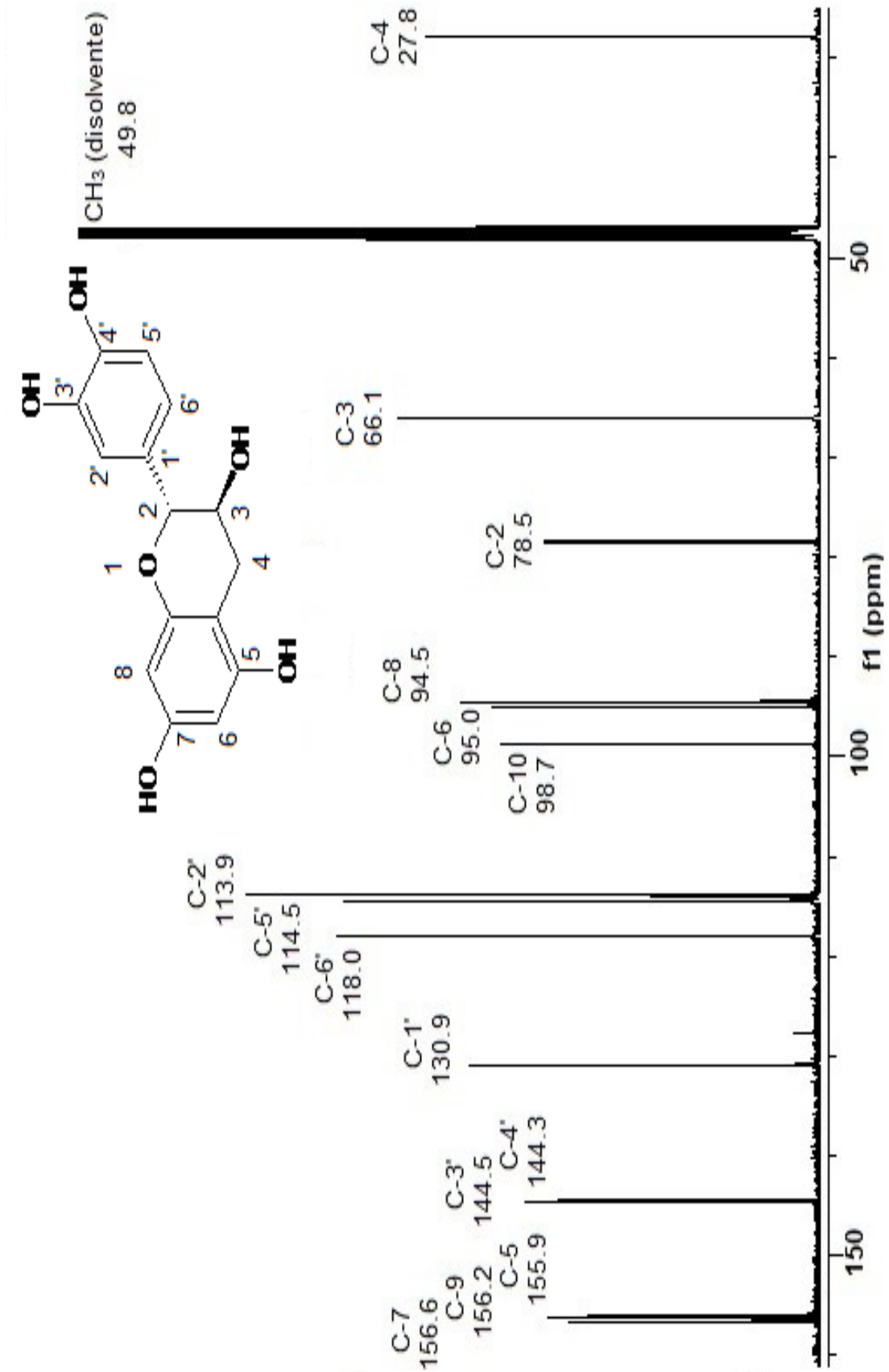


Figura 36. Espectro de RMN- ^{13}C de (+)-catequina ($\text{MeOH-}d_4$, 100 MHz).



6.2. IDENTIFICACIÓN DE CATEQUINAS POR HPLC

Se eligió un método de HPLC para la identificación de la presencia de catequinas en la especie de muérdago *Cladocolea loniceroides*. Bajo la técnica analítica del inciso 5.1.8. y con las debidas recomendaciones de Merken & Beecher (2000) se llevó a cabo el análisis variando las condiciones, en gran parte ésta detección está basada en la absorción de UV-Vis y una sola longitud de onda no es ideal para todas las clases de flavonoides, puesto que estos muestran máximos de absorción a diferentes longitudes de onda. Es muy común el uso de un detector de arreglo de diodos (DAD) el cual permite la cuantificación simultánea a diferentes longitudes de onda (Mattila, Astola & Kumpulainen, 2000.)

En la Figura 37 se puede observar el perfil cromatográfico de 28 polifenoles diferentes y el orden aproximado en el que aparecen a $\lambda=280$ nm (Andersen & Markham, 2006).

Con lo anterior en mente, se llevó a cabo la inyección de la muestra metanólica del extracto en el cromatógrafo de líquidos con el fin de obtener el perfil cromatográfico de la especie (Figura 38), posteriormente se inyectaron estándares de (-)-epicatequina (Figura 39) y (+)-catequina (Figura 40) Sigma Aldrich®.

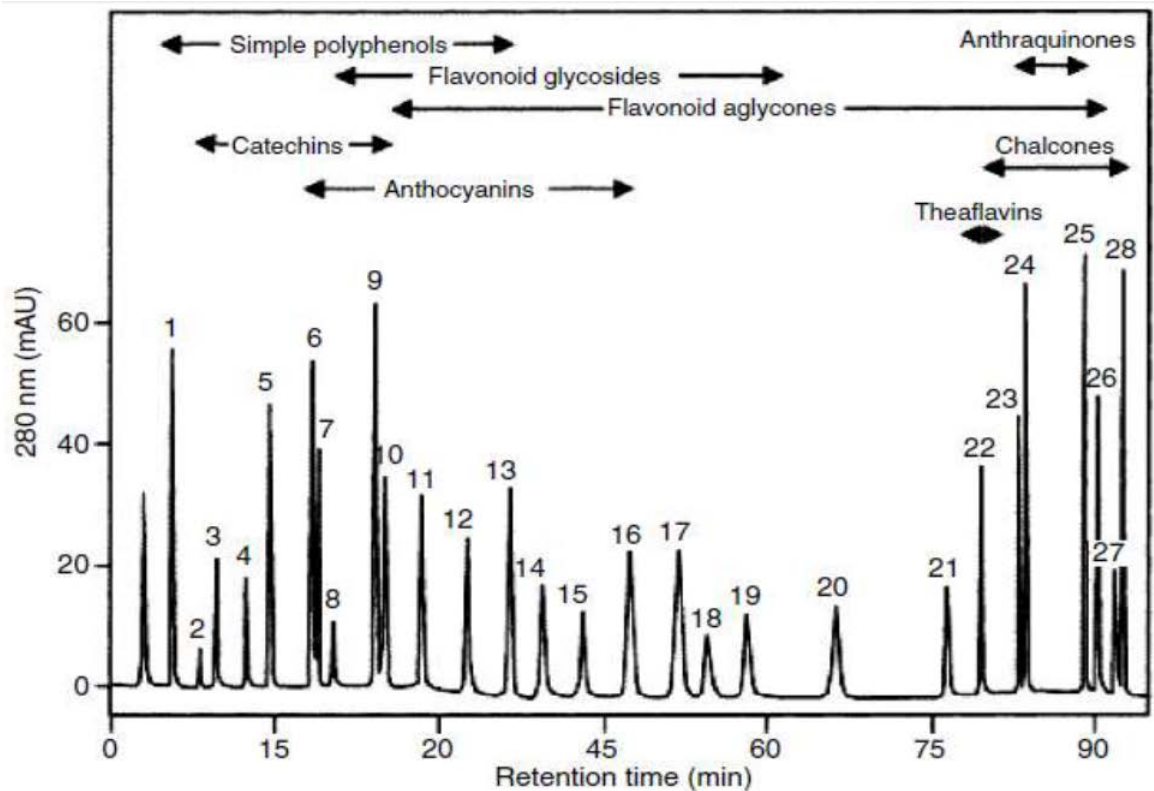


Figura 37. Perfil cromatográfico de 28 diferentes polifenoles, columna Capcell pack C₁₈ UG120 (250 x 4.6 mm, S5, 5 μm) a 35°C. Solución A (fosfato de sodio 50 mM [pH 3.3] y metanol 10%) solución B (metanol 70%). Gradiente de elución 0 min 100% A, 0-15 min 70% A, 15-45 min 65% A, 45-65 60%A, 65-70% 70% A y 70-95 100% B, con un flujo de 1 mL/min.

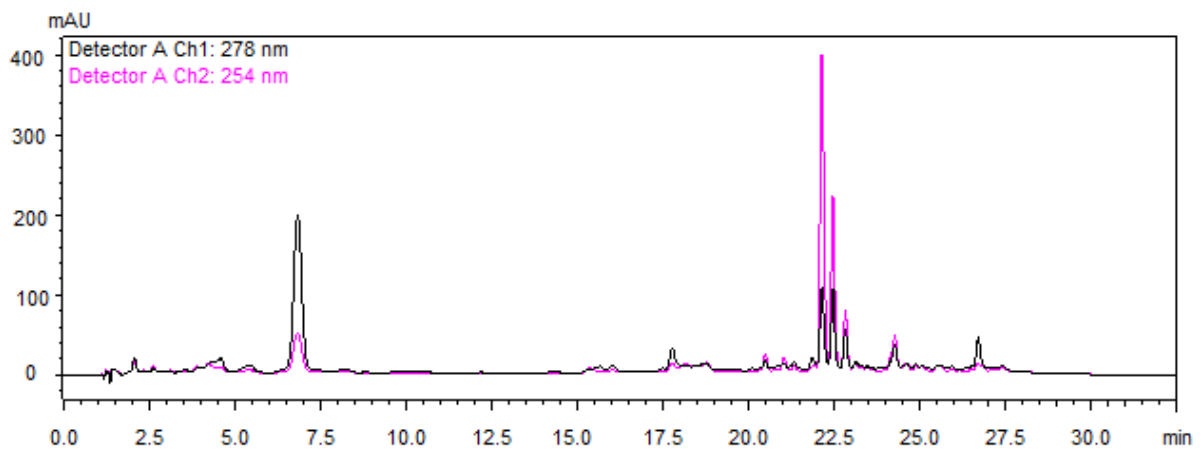


Figura 38. Cromatograma del extracto metanólico de *C. Ioniceroides* en condiciones normales de operación, mostrando picos relevantes a $T_R = 6.941$ y 22.404 min.

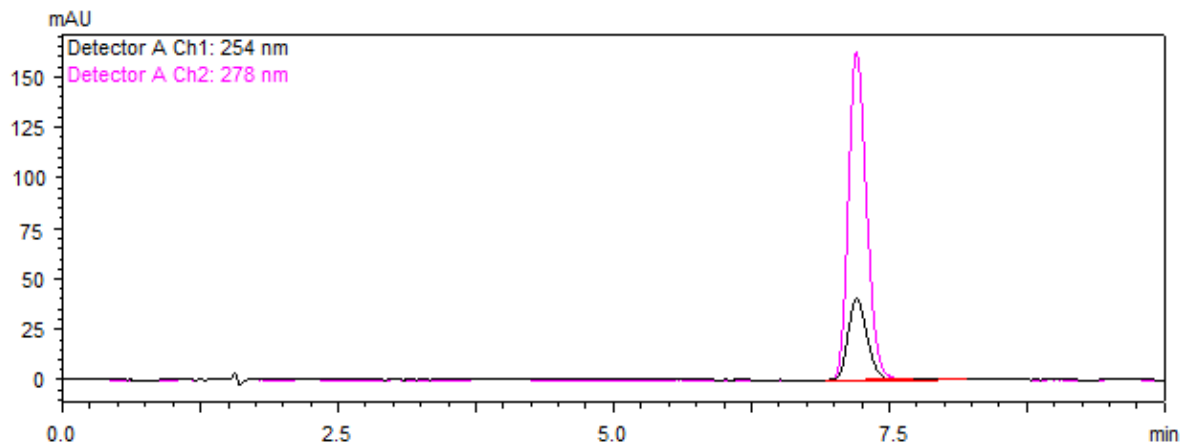


Figura 39. Cromatograma del estándar de (-)-epicatequina (200 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones normales de operación. $T_R = 6.791$ min.

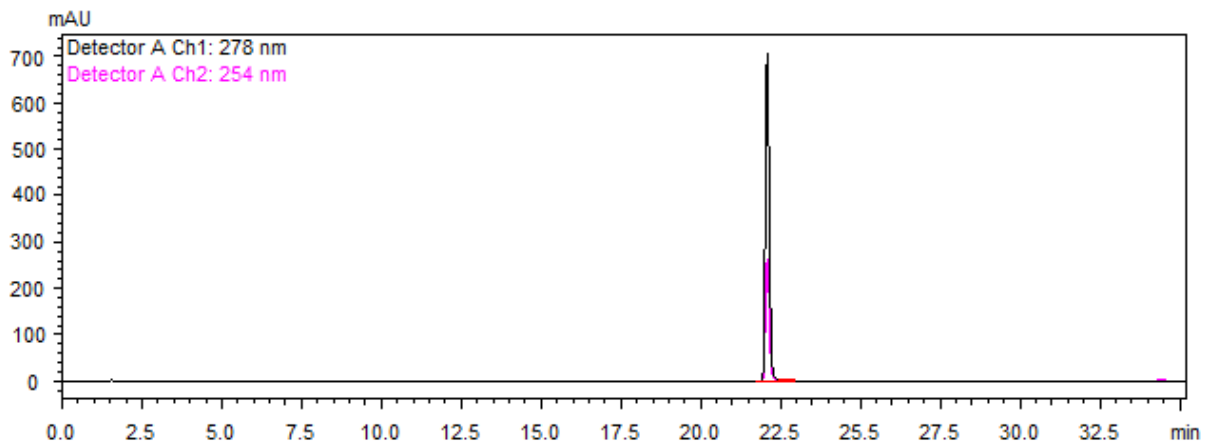


Figura 40. Cromatograma del estándar de (+)-catequina (200 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones normales de operación. $T_R = 22.254$ min.

El tiempo de retención para el pico identificado como (-)-epicatequina del extracto metanólico fue de 6.941 min y el tiempo de retención del estándar fue de 6.791 min, en cuanto al pico identificado como (+)-catequina del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* tuvo un tiempo de retención de 22.404 min y el tiempo de retención del estándar fue de 22.254 min; 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 $\pm 10\%$ según el método.



Las catequinas identificadas fueron la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, esto era algo esperado, dado que como se mencionó anteriormente, con la técnica cromatográfica de HPLC se quería corroborar al 100% la existencia de éstos compuestos en el extracto metanólico, prueba contundente de identidad de éstas moléculas diastereoisoméricas.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores y especialmente en aquellas con sistema vascular; se encuentran en las partes aéreas, en los capullos y hojas jóvenes. Son compuestos fenólicos, responsables de la coloración de las flores y de ciertas frutas (Markham & Ofman, 1993), aunque también existen casos de flavonoides incoloros en la naturaleza (Lotito & Frei, 2006), son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos, solubles en agua (Winkel, 2001) y poseen un máximo de absorción de luz a los 280 nm.

Los flavonoides son compuestos ubicuos que encontramos en una gran diversidad de plantas y alimentos; por lo anterior, no es sorprendente que en diferentes especies de muérdago se hayan aislado el mismo tipo de flavonoides. Se cree que los flavonoides son responsables de la mayoría de las actividades biológicas; además de los flavonoides, los compuestos fenólicos y aromáticos representan un grupo de productos activos farmacológicamente importantes presentes en *Cladocolea loniceroides*.

Las catequinas se clasifican dentro del grupo de los flavonoles, llamados también proantocianidinas o flavan-3-ol. Este grupo de flavonoides incluye a la catequina, epicatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina. En la naturaleza, encontramos que estos compuestos están presentes en frutas como cerezas, manzanas, ciruelas, fresas; en semillas y granos como la cocoa, nueces; en



vegetales como el té negro, té verde, el oolong y sin duda alguna en el vino tinto (Yilmaz, 2006).

La (-)-epicatequina, la (+)-catequina, y sus oligómeros, representan una de las clases de flavonoides más distribuidos en la literatura (Jiménez, Duarte & Pérez, 2012). Estos compuestos se encuentran en altas concentraciones en frutos como las manzanas (Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold, etc.) en concentraciones en un rango de 67 a 96 mg/kg; aguacates de 2.69 a 8.51 mg/kg, durazno de 17.64 a 28.96 mg/kg, arándanos rojos de 42.0 a 51.3 mg/kg, uvas de 86.4 a 91.8 mg/kg, peras de 28.69 a 31.19 mg/kg y chocolate oscuro de 132.4 a 327.4 mg/kg (Arts, Van de Putte & Hollman, 2000). En plantas medicinales se le ha encontrado en especies como *Camellia sinensis* e *Hipocratea excelsa*. Los contenidos de flavonoides en estas especies son variables y pueden modificarse como consecuencia del procesamiento.

6.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.3.1. Ensayo DPPH

6.3.1.1. Condiciones preliminares para el ensayo DPPH

Para determinar la actividad antioxidante por el ensayo DPPH[•], el rango de longitudes de onda varía entre los 515 y 540 nm (Murillo *et al.*, 2007); para este trabajo se midió a $\lambda = 517$ nm donde presenta su máxima absorción. La solución de DPPH[•] se preparaba minutos antes de realizar el ensayo, debido a que tiende a degradarse rápidamente por efectos de la luz y la temperatura (Molyneux, 2003).



6.3.1.2. Determinación de la actividad antioxidante (AAOx) por el método del DPPH*

El extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* a 1000 ppm (Diagrama 4), se consideró como extracto activo, ya que presentó un %AAOx superior al 25%; valor que se usó como referencia considerando que equivale a la mitad de la actividad antioxidante presentada por la hidroquinona, utilizada como control positivo.

En la Tabla 16 se muestra el %AAOx correspondiente al extracto evaluado, el cual presentó un valor superior al 25%.

Tabla 16. Porcentaje de la actividad antioxidante del extracto metanólico *C. loniceroides* por el ensayo de DPPH*.

% Actividad Antioxidante		Promedio %AAOx	DS
Ensayo 1	Ensayo 2		
38.54	40.00	39.27	1.03

El %AAOx obtenido se puede deber a metabolitos secundarios de *Cladocolea loniceroides*, como lo son los flavonoides aislados en éste proyecto, a los que se les atribuye una potente capacidad de actuar en la reducción de concentración de los radicales libres en estado estacionario en sistemas biológicos y con ello proporcionar protección antioxidante, ésta es una suposición basada en la estructura química de los flavonoides que apoyan su capacidad de eliminar los radicales libres y metales redox-activo de quelato (Galleano, Verstraeten, Oteiza & Fraga, 2010).

En la Figura 41 se muestra la comparación del %AAOx de extractos metanólicos de 7 plantas (Tovar, 2013) con composición química similar al de *Cladocolea loniceroides*, evaluadas mediante la misma técnica de determinación de la actividad antioxidante descrita y realizada en éste proyecto junto con el control positivo hidroquinona. Para los extractos



metanólicos las especies con mayor actividad fueron *Palicourea andaluciana*, *Piper crassinervium* y *Cladocolea loniceroides* con valores de %AAOx de 27.98%, 27.85% y 39.27% respectivamente, considerándolos como activos debido a que presentan un %AAOx ≥ 25 .

Cimanga *et al.*, (2010) determinaron la presencia de saponinas, flavonoides, terpenos, esteroides, taninos y antraquinonas en la familia Rubiaceae a la cual pertenece *Palicourea andaluciana*, además de exhibir actividad antiespasmódica que se puede atribuir principalmente a la presencia de flavonoides.

La especie vegetal *Piper crassinervium* pertenece a la familia Piperaceae, la cual, en la medicina popular se le atribuye a combatir malestares hepáticos, males del riñón y para mejorar la circulación de la sangre, esto debido a amidas, alcaloides, flavonoides y polifenoles que la constituyen (Kato & Furlan, 2007).

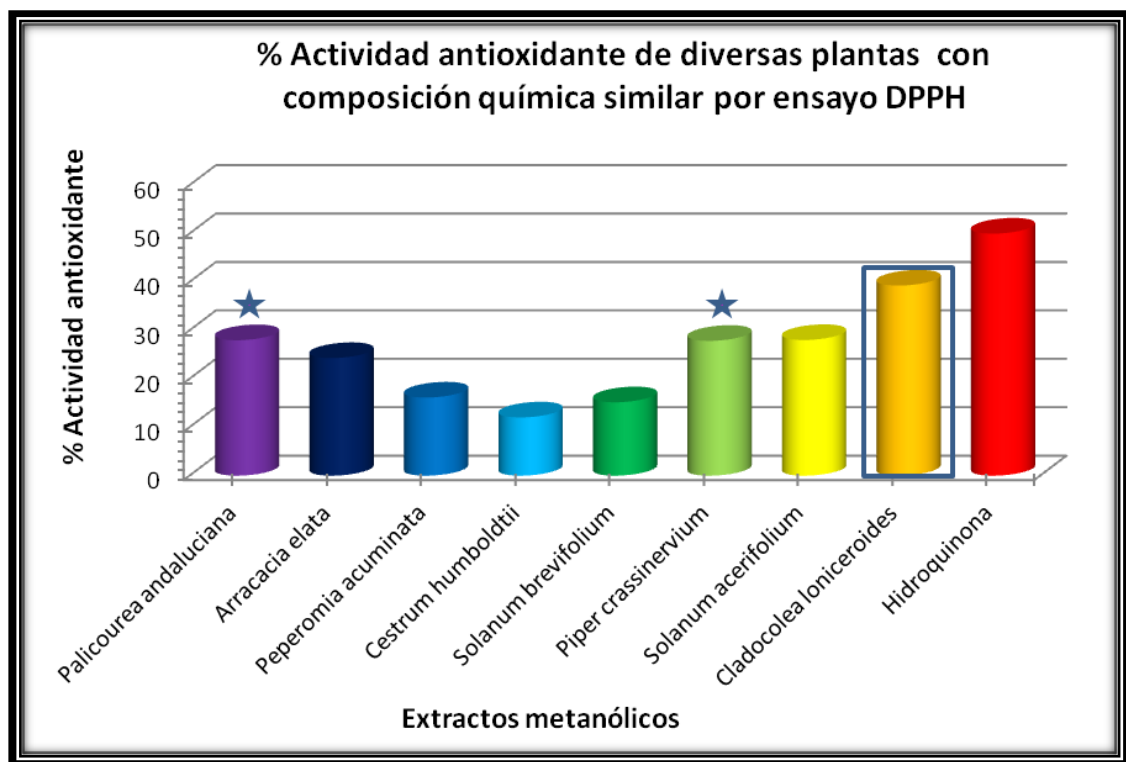


Figura 41. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de plantas evaluadas por el ensayo DPPH*.



6.3.1.3. Determinación de la concentración media inhibitoria

La IC₅₀ (µg/mL) mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica y/o bioquímica (Joshi, Verma & Mathela, 2010). En este trabajo se midió la concentración del extracto vegetal activo (%AAOx ≥ 25) necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH, teniendo en cuenta que una IC₅₀ baja, está directamente asociado con una actividad antioxidante alta (Zhu, Lian, Guo, Peng & Zhou. 2011). En otros trabajos se reportaron criterios de selección para extractos vegetales con base en el IC₅₀; considerando de alto potencial antioxidante aquellos con valores menores a 30 µg/mL, con moderado potencial ubicados en un rango entre 30 µg/mL y 100 µg/mL y de bajo potencial antioxidante aquellos con un IC₅₀ por encima de 100 µg/mL (Ramos *et al.*, 2003).

Se determinó la IC₅₀ de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH• y ABTS•⁺ (Diagrama 3) para el extracto metanólico. Los porcentajes de actividad antioxidante obtenidos para el extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* mediante el ensayo DPPH• en sus diferentes concentraciones se presenta en la Tabla 17; donde se aprecia un %AAOx ≥ 25 a partir de la concentración de 50 ppm del extracto.

Tabla 17. Porcentaje de la actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo de DPPH• para el extracto metanólico de *C. loniceroides*, evaluado a diferentes concentraciones.

Concentración	% Actividad Antioxidante		Promedio %AAOx	DS
	Ensayo 1	Ensayo 2		
10 ppm	10.97	14.77	12.87	2.69
50 ppm	32.06	34.02	33.04	1.39
100 ppm	33.33	36.76	35.05	2.43
250 ppm	38.49	38.83	38.66	0.24
500 ppm	40.37	40.54	40.46	0.12



En la Tabla 18 se muestra el IC₅₀ de la AAOx mediante el método DPPH[•] de los extractos metanólicos de *Palicourea andaluciana*, *Piper crassinervium* y *Cladocolea loniceroides*, los 2 primeros reportados en la literatura (Tovar, 2013) cuya técnica usada fue la misma que se utilizó en éste proyecto, mencionados ya que poseen una composición semejante a la planta analizada en éste trabajo y como se mencionó anteriormente, con un %AAOx ≥ 25 .

Tabla 18. Concentración inhibitoria 50 de la actividad antioxidante para los extractos metanólicos.

Nombre de la planta	Extractos en metanol Ensayo DPPH	
	%AAOx (500 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Palicourea andaluciana</i>	27.98	137.6
<i>Piper crassinervium</i>	27.85	252
<i>Cladocolea loniceroides</i>	40.46	7.24
Hidroquinona (control positivo)	50.08	----

Cladocolea loniceroides mostró el IC₅₀ más bajo con un valor de 7.24 µg/mL, el cual indica un alto potencial antioxidante según la clasificación de Ramos *et al.*, (2003). Entre tanto, en la literatura se encontró que el antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) presentó un IC₅₀ de 11.5 µg/mL (Trabelsi *et al.*, 2012); al comparar este valor con el obtenido por el extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* se confirma la destacada actividad y se puede inferir que éste es un antioxidante natural promisorio.



6.3.2. Ensayo ABTS^{•+}

6.3.2.1. Condiciones preliminares para el ensayo ABTS^{•+}

El ensayo ABTS^{•+} se basa en la transferencia de electrones; por lo cual los diferentes compuestos antioxidantes presentes en el extracto, donan uno o dos electrones para reducir el radical catión como se observa en la Figura 24 (Osman, Wong & Fernyhough, 2006), dando una medida precisa de la capacidad antioxidante total en el punto final de reacción (Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011). La formación del radical catión ABTS^{•+} fue inducida mediante la adición del persulfato de potasio; se incubó durante 16 horas y se almacenó en la oscuridad, puesto que éste es muy sensible a la luz y se degrada rápidamente. (Re *et al.*, 1999).

6.3.2.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+}

Para este ensayo se midió el %AAOx del extracto frente al radical catión ABTS^{•+}. Se analizó después de saber que en el ensayo del DPPH[•] se consideró como extracto activo, los resultados del ensayo en concentraciones de 10, 50, 100, 250, 500 µg/mL se muestran en la Tabla 19 donde se aprecia un %AAOx ≥ 25 a partir de la concentración de 250 ppm del extracto.

Tabla 19. Porcentaje de actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS^{•+} para el extracto metanólico de *C. loniceroides*, evaluado a diferentes concentraciones.

Concentración	% Actividad Antioxidante		Promedio %AAOx	DS
	Ensayo 1	Ensayo 2		
10 ppm	2.34	1.31	1.83	0.73
50 ppm	10.05	12.03	11.04	1.40
100 ppm	23.44	24.39	23.92	0.67
250 ppm	48.52	48.78	48.65	0.18
500 ppm	92.29	93.11	92.70	0.58

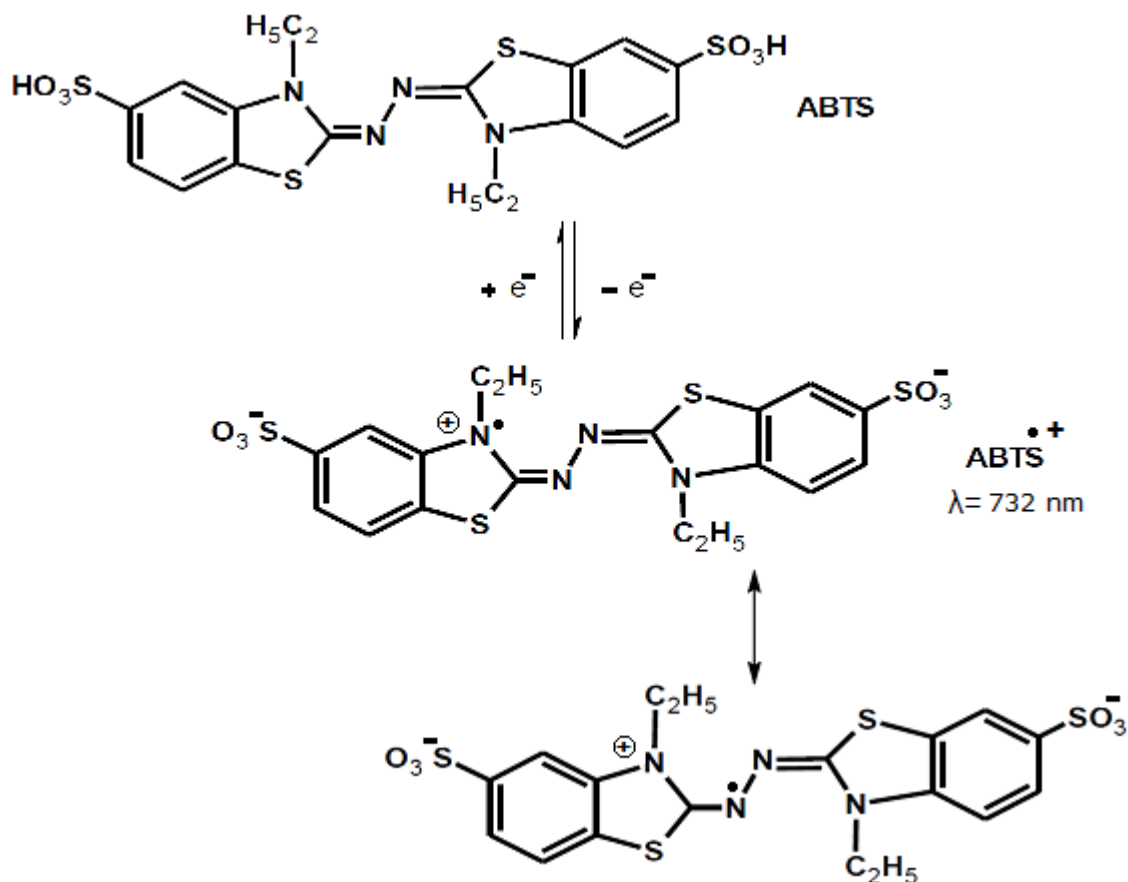


Figura 42. Estructura del ABTS y del radical catión ABTS^{•+}.

En la Tabla 20 se presenta el IC₅₀ de la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} y el %AAOx obtenido a una concentración de 500 µg/mL para los extractos metanólicos de *Palicourea andaluciana*, *Piper crassinervium* (Tovar, 2013) y *Cladocolea loniceroides*, datos comparables ya que éstas especies se analizaron bajo la misma técnica.

La especie *Cladocolea loniceroides* obtuvo un porcentaje de actividad antioxidante destacado con valor de 92.70% y una IC₅₀ de 2886 µg/mL. Muchas evidencias experimentales han mostrado que hay una relación no-lineal entre la concentración del antioxidante y la concentración del radical DPPH[•] (Zheng & Wang, 2001) y como consecuencia de esto, la determinación del IC₅₀ se hace un poco más compleja, puesto que en la



regresión no-lineal deben tenerse en cuenta factores como el modelo de regresión que se va a utilizar y las opciones de ponderación.

Tabla 20. Porcentaje de la actividad antioxidante por el ensayo ABTS^{•+} para cada extracto de metanol activo y su respectiva concentración inhibitoria 50.

Nombre de la planta	Extractos de metanol Ensayo ABTS ^{•+}	
	%AAOx (500 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Palicourea andaluciana</i>	23.79	3588
<i>Piper crassinervium</i>	23.38	3466
<i>Cladocolea loniceroides</i>	92.70	2886
Hidroquinona (control positivo)	98.08	----

En este trabajo la determinación de este parámetro (IC₅₀) se llevo a cabo a través del modelo de regresión no-lineal log(dosis) vs respuesta, generándose una curva, ajustando por medio de mínimos cuadrados los datos experimentales tanto como sea posible, hallando un modelo de ecuación adecuado (Zheng & Wang, 2001). Si en la reacción del antioxidante con el radical catión ABTS^{•+} el porcentaje de actividad antioxidante aumenta proporcionalmente al aumento de la concentración y no consigue un estado estacionario, se puede inferir que el valor IC₅₀ va a ser muy alto en el momento de hacer la regresión no lineal lo cual podría explicar los valores obtenidos para el extracto vegetal por medio del ensayo ABTS^{•+}.

El material de estudio fue seleccionado con base en sus usos en la medicina tradicional y por su potente efecto antioxidante (40.46% de neutralización para el radical DPPH[•] y 92.70% para el radical catiónico ABTS^{•+}), importante criterio para seleccionar la materia prima destinada al descubrimiento de sustancias biológicamente activas (Cox & Balick, 1994; Houghton, 2001; Fabricant & Farnsworth, 2001).



6.2. DETERMINACIÓN DE EQUIVALENTES TROLOX

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromen-2-carboxílico (Trolox) es un análogo del α -tocoferol soluble en agua. Es conocido por su alta capacidad antioxidante y por tanto es utilizado como compuesto de referencia y la AAOx es expresada como equivalentes Trolox (Oehlke, Heins, Stöckmann, Sönnichsen & Schwarz, 2011), principalmente para los métodos de DPPH \bullet y ABTS \bullet^+ .

Para realizar comparaciones con otras investigaciones del porcentaje de captación de radicales libres es necesario unificar unidades para lo cual es utilizado usualmente el Trolox (Arts, Haenen, Voss & Bast, 2004), puesto que en los protocolos seguidos por los diferentes investigadores para la determinación de la AAOx varían las condiciones (proporciones de los reactivos, concentraciones y tiempos de medición).

Por ello, se realizó una curva de calibración con Trolox para el ensayo DPPH \bullet (Figura 43) con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9981$ y otra para el ensayo ABTS \bullet^+ (Figura 44) con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9971$, a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Cladoclea loniceroides* evaluada en μg Trolox/g de extracto. Los respectivos %AAOx para cada concentración de Trolox evaluada se presentan en la Tabla 21.

En la Tabla 22 se muestran la actividad antioxidante de los extractos de metanol activos, obtenidos mediante los ensayos de DPPH \bullet y ABTS \bullet^+ expresada en equivalentes Trolox a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

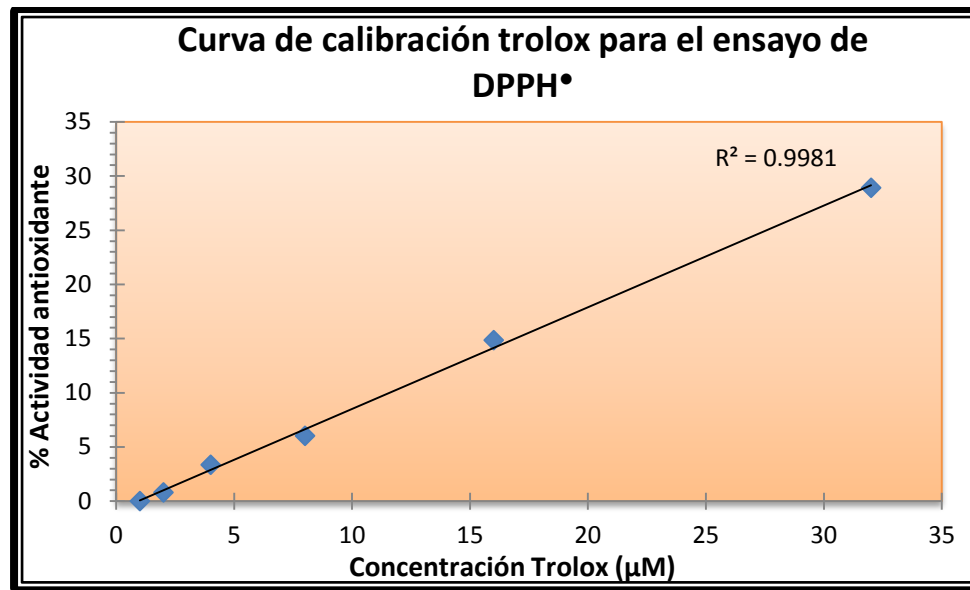


Figura 43. Curva de calibración Trolox para el ensayo de DPPH[•].

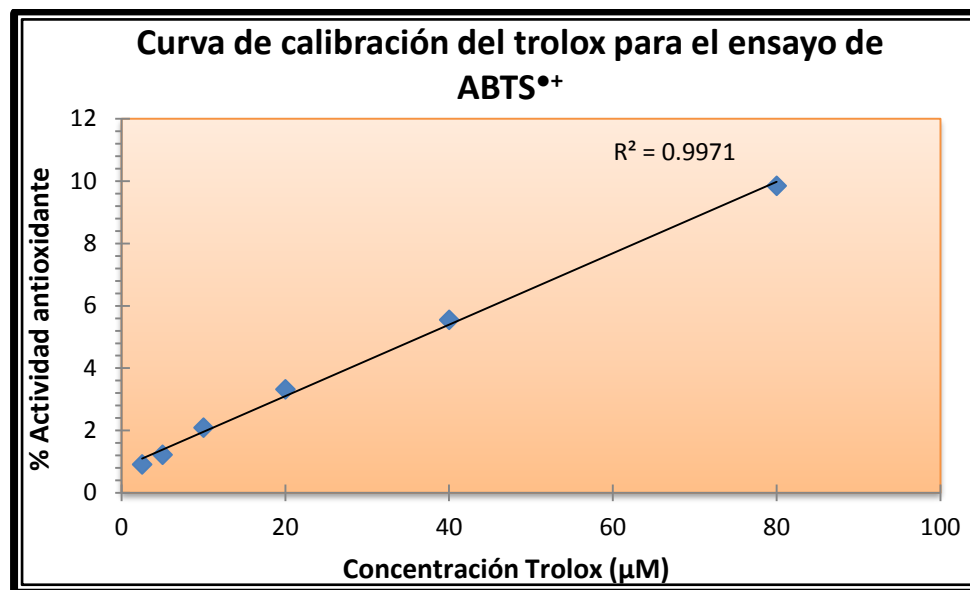


Figura 44. Curva de calibración del Trolox para el ensayo de ABTS^{•+}.



Tabla 21. Porcentaje de la actividad antioxidante a diferentes concentraciones de Trolox.

Concentración Trolox (μM)	% AAOx
1	0
2	0.80
4	3.35
8	6.02
16	14.85
32	28.91

Tabla 22. Concentración en equivalentes Trolox de los extractos de metanol activos por los métodos de DPPH[•] y ABTS^{•+}.

Nombre de la planta	Equivalentes Trolox (μg de Trolox/g de extracto)	
	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
<i>Palicourea andaluciana</i>	27.01	212.72
<i>Piper crassinervium</i>	25.15	203.02
<i>Cladocolea loniceroides</i>	44.06	852.00
Hidroquinona (control positivo)	54.31	901.91

Para los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+} se puede observar que la especie más destacada por sus concentraciones altas de equivalentes Trolox es *Cladocolea loniceroides* con valores de 44.06 y 852 μg de Trolox/g de extracto, respectivamente, en comparación con las 2 especies anteriormente mencionadas *Palicourea andaluciana* y *Piper crassinervium* (Tovar, 2013), extractos de metanol activos.

Se encontró una alta correlación entre ambos ensayos (DPPH[•] y ABTS^{•+}), tal como se observó en otras investigaciones (Babbar, Oberoi, Uppal & Patil, 2011; Floegel, Kim, Chung, Koo & Chun, 2011), con un $R^2 = 0.9364$ (Figura 45), lo cual muestra que los extractos evaluados tienen actividades comparables por ambos métodos y por tanto que estos son reproducibles al momento de medir la actividad antioxidante.

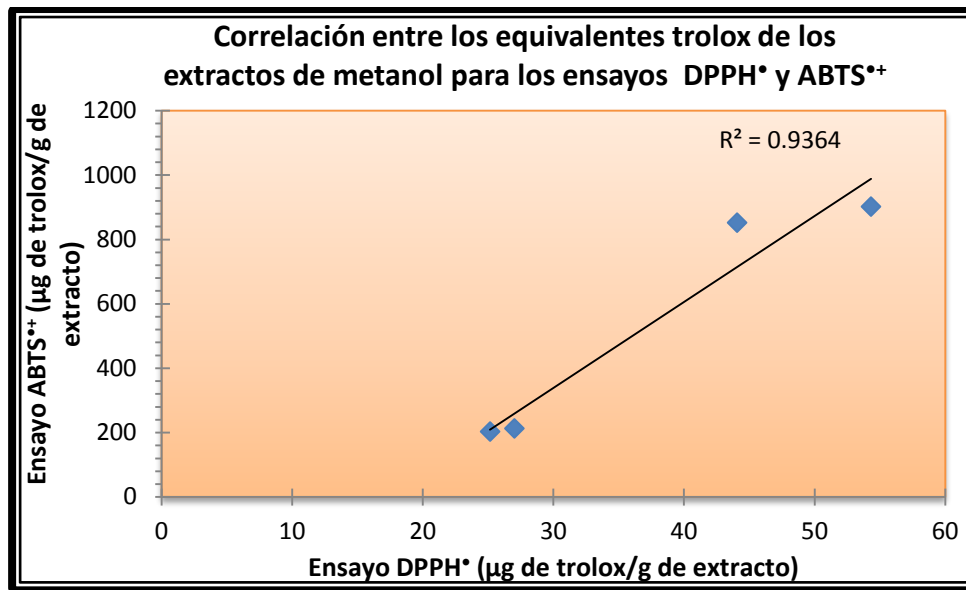


Figura 45. Correlación entre los equivalentes Trolox de los extractos de metanol para los ensayos DPPH* y ABTS**.

Se observó también que mediante el ensayo ABTS** se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante mucho más altos que por medio del ensayo DPPH*, lo cual concuerda con datos reportados por Floegel *et al.*, (2011). Hay algunas razones por medio de las cuales se podría dar explicación a este hecho, la primera se basa en la longitud de onda a la cual se realizaron las medidas para cada ensayo.

Para en el ensayo ABTS** se tomó una $\lambda = 732$ nm, mientras que, para el ensayo DPPH* se midió a $\lambda = 517$ nm. Desde la región del visible hay interferencias en la medición de compuestos coloreados como antocianinas y carotenoides que estén presentes en los extractos evaluados a 517 nm (Beserra *et al.*, 2011).

Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH* con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH* está impedido estéricamente (Beserra *et al.*,



2011). Por último, esta diferencia podría estar basada en la reacción reversible del radical DPPH[•] con fenoles como eugenol y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante (Bondet *et al.*, 1997).

Como se mencionó, se encontraron diferencias entre los dos ensayos de captura de radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}) empleados y se dieron algunas razones que podrían explicar dichas diferencias. Además, es necesario mencionar otra posible explicación, ya que aunque ambos ensayos miden la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para capturar el radical libre preformado, sus condiciones de reacción y cinética son diferentes. El radical libre DPPH[•] es estable en su formación por fácil disolución en metanol. En contraste, el radical catión ABTS^{•+} se crea por reacción entre el ABTS con el oxidante, persulfato de potasio, lo cual lo hace menos estable y más transitorio.

En términos de tiempo de corrida, los extractos reaccionan más lentamente con el radical DPPH[•] necesitando 30 minutos para alcanzar su estado estacionario lo cual lo pone en desventaja con el radical catión ABTS^{•+}, el cual alcanza su estado estacionario muy rápidamente (Jayasri, Mathew & Radha, 2009); por tanto, la estequiometría de las reacciones y el mecanismo de reacción son muy distintos.

Otra diferencia importante entre ambos ensayos es que el ABTS^{•+} puede ser disuelto en un medio orgánico u acuoso y en ambos puede medirse su actividad antioxidante teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra (Wojdylo, Oszmiański & Czemerys, 2007). Contrario a esto, el DPPH[•] solo puede medirse en un medio orgánico, lo cual es un limitante para la interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos evaluados (Surveswaran, Cai, Corke & Sun, 2007) y podría



ser una razón para la diferencia presentada entre el potencial de captura.

Pérez & Saura (2006) analizaron la influencia del solvente en la capacidad antioxidante, encontraron que en el ensayo ABTS^{•+}, los extractos en agua presentaron 40% más actividad antioxidante que aquellos disueltos en metanol-agua (50:50 v/v); por el contrario, en el ensayo DPPH[•] se pudo observar claramente una disminución de la actividad en los extractos acuosos.

Estudios epidemiológicos han demostrado una relación inversa entre la ingesta de las catequinas y el riesgo de ECV. El amplio rango de actividades biológicas descritas para especies ricas de los flavan-3-oles apoyan la potencial protección cardiovascular, incluyendo los efectos sobre el tono vascular, la función endotelial, la presión sanguínea, la resistencia a la insulina, la tolerancia a la glucosa, la reactividad plaquetaria, y protección de los sistemas inmune y antioxidante. Los flavonoides son compuestos de importancia a nivel cardiovascular, se ha demostrado que hay una asociación inversa entre la ingesta diaria de flavonoides y la mortalidad a causa de una enfermedad coronaria. Este efecto cardioprotector podría explicarse por la combinación de propiedades antioxidantes, antiagregantes plaquetarias y vasodilatadoras (Carroll, Guthrie, So & Chambers, 1998).

El descubrimiento de estas propiedades resulta interesante y útil particularmente como fuente de AOx naturales, alimentos funcionales y nutracéuticos (Miliauskas, Venskutonis & Van Beek, 2004).



7. CONCLUSIONES

Esta investigación representa una contribución al conocimiento de la especie *Cladocolea loniceroides*, planta medicinal utilizada en las prácticas médicas tradicionales del centro y sur de México, ya que un compuesto se detectó y dos se aislaron, los cuales no habían sido reportados para la especie en estudio. Para llegar a ratificar y elucidar las estructuras de dichos compuestos se utilizó la técnica de LC-MS para el compuesto cinarina (**1**), RMN y HPLC para los compuestos (-)-epicatequina (**2**) y (+)-catequina (**3**).

El método LC-MS resultó ser muy eficiente para dilucidar de manera contundente la presencia de un determinado tipo de ácido fenólico de acuerdo a su peso molecular.

El análisis del extracto metanólico por HPLC permitió identificar a la (-)-epicatequina y la (+)-catequina como los constituyentes mayoritarios de *Cladocolea loniceroides* del álamo blanco.

El extracto metanólico de la especie de muérdago *Cladocolea loniceroides* que infesta a los olmos blancos es una fuente para la obtención de polifenoles.

La actividad antioxidante del extracto metanólico de hojas por el ensayo ABTS^{•+} fue significativamente mayor a la obtenida por el ensayo DPPH[•]; sin embargo, se encontró una buena correlación entre ambos. El extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* presentó porcentajes altos de actividad antioxidante con valores de neutralización para el radical DPPH[•] de 40.46% (44.06 µg de Trolox/ g de extracto) y 92.70% (852.00 µg de Trolox/ g de extracto) en el ensayo de neutralización del radical catiónico ABTS^{•+}, la alta AAOx pudiéndose deber a la cinarina, (-)-epicatequina y (+)-catequina.



8. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en éste trabajo marcan una pauta para un estudio de producción de metabolitos de la especie *Cladocolea loniceroides* para ello será necesario:

- ❖ Aislar y caracterizar los compuestos minoritarios del extracto metanólico de *Cladocolea loniceroides* analizado.
- ❖ Determinar el contenido de fenoles totales del extracto.
- ❖ Realizar pruebas de antioxidantes empleando reactivos específicos *in vivo*, utilizando ratas como modelo experimental.
- ❖ Con el conocimiento de la actividad antioxidante, proporcionar una estimación de su potencial terapéutico.
- ❖ Evaluación farmacológica para pruebas específicas relacionadas con el uso tradicional de la planta, ya que la composición química de *Cladocolea loniceroides* la hace una fuente promisoría de búsqueda de biomoléculas con actividades biológicas.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M. N.; Bristi, N. J. & Rafiquzzaman, M. (2012). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Alvarado R., D. y Saavedra R., L. de L. (2005). El género *Cladocolea* (Loranthaceae) en México: muérdago verdadero o injerto. *Revista Chapingo*, 11(1), 5-9.
- Andersen, Q. M. & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids-chemistry, biochemistry and applications*. USA: Tailor & Francis Group.
- Ara R., A. (2004). *100 Plantas Medicinales Escogidas*. (4ª ed.). España: Edaf.
- Arts, I. C.; Van de Putte, B. & Hollman, P.C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1746-1751.
- Arts, M.; Haenen, G.; Voss, H-P. & Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 45-49.
- Asociación Mexicana de Arboricultura. (2009). *El Muérdago en la Ciudad de México*. (Informe de Actividades 2008). México: Autor.
- Babbar, N.; Oberoi, H. S.; Uppal, D. S. & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391-396.
- Beserra A., M. M.; Machado de S., P. H.; Campos A., A. M.; Do Prado, G. M.; Carvalho, C. E.; Arraes M., G. & Gomes de L., T. L. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159.
- Blois, M. S. (1988). Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.



- Bondet, V.; Brand-Williams, W. & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Bors, W. & Michel, C. (1999). Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1413-1426.
- Bors, W. & Saran, M. (1987). Radical Scavenging by Flavonoid Antioxidants. *Free radical research communications*, 2(4-6), 289-294.
- Bruneton, J. (2002). *Farmacognosia. Plantas medicinales*. (2^a ed.). España: Acribia.
- Carretero A., M. E. (2000). Plantas Medicinales: Compuestos fenólicos. *Panorama Actual del Medicamento*, 24(232), 340-344.
- Carroll, K. K.; Guthrie, N.; So, F. V. & Chambers, A. F. (1998). Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. In C. A. Rice E., & L., Packer (Eds.), *Flavonoids in Health and Disease* (pp. 437-446). USA: Marcel Dekker.
- Castroviejo B., S.; Acedo, C.; Benedí, M.; Laínz, F.; Muñoz, G.; Nieto, G. y Paiva, J. (1997). *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, Vol. VIII*. España: Real Jardín Botánico.
- Cházaro B., M.; Huerta M., F. M.; Patiño B., R.M.; Sánchez F., R.; Lomelí M., E. y Flores M., A. (1992). Los muérdagos (Loranthaceae) de Jalisco, parásitas poco conocidas. *Ciencia y Desarrollo*, 17(102), 70-85.
- Cházaro B., M. de J.; Oliva R., H.; Ramón F., F. y Vázquez G., J. A. (2005). *Cladocolea oligantha* (Loranthaceae) un nuevo registro para Veracruz, México, y datos generales sobre este taxón. *Polibotánica*, 20, 1-15.
- Cid V., R.; Ponce, S. & Engleman, M. (2005, julio). *Germination of Cladocolea loniceroides (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae)*. Information submitted to XVII International Botanical Congress. Viena, Austria.
- Cimanga, R. K.; Mukenyi, P. N. K.; Kambu, O. K.; Tona, G. L.; Apers, S.; Totté, J.; Pieters, L. & Vlietinck, A. J. (2010). The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of *Morinda morindades* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 127, 215-220.



- Clarkson, P. M. (1995). Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1-2), 131-141.
- Coder, K. D. (2006). Muérdago Americano. Besando bajo un parásito. *Arbórea*, 8(18-19), 6-15.
- Coinu, R.; Carta, S.; Urgeghe, P. P.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Franconi, F. & Romani, A. (2007). Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from *Violetto di Toscana* artichoke. *Food Chemistry*, 101(2), 524-531.
- Cook, N. C. & Samman, S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Cox, P. A. & Balick, M. J. (1994). The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery. *Scientific American*, 270(6), 82-87.
- Davis, A. L.; Cai, Y.; Davies, A. P. & Lewis, J.R. (1996). ¹H and ¹³C NMR Assignments of Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34(11), 887-890.
- De la Paz Pérez O., C.; Ceja R., J. y Vela R., G. (2006). Árboles y muérdagos: Una relación que mata. *ContactoS*, 59, 28-34.
- Deng, J.; Cheng, W. & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430-1435.
- Doria, E.; Buonocore, D.; Focarelli, A. & Marzatico, F. (2012). Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2012. 13 páginas.
- *Drogas más comunes de la medicina tradicional Argentina*. (2011, marzo). Comunicación presentada al Seminario de Herboristería. Patagonia, Argentina.
- Duarte, J.; Pérez V., F.; Zarzuelo, A.; Jiménez, J. & Tamargo, J. (1993). Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 239(1-3), 1-7.



- Durán R., G. E.; Zúñiga R., B.; Muñoz O., V.; Herrera S., J.; Guevara F., P. y Pérez A., M. C. (2010, noviembre). *Cladocolea loniceroides* (Loranthaceae), hemiparásita con actividad antimicrobiana. Comunicación presentada al XVIII Congreso Mexicano de Botánica. Guadalajara, México.
- Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 69-75.
- Ferrer A., J. R. (1997). *Las células de los tejidos vegetales*. España: Ediciones Veda.
- Floegel, A.; Kim, D-O.; Chung, S-J.; Koo, S. I. & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Fratianni, F.; Tucci, M.; De Pama, M.; Pepe, R. & Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*, 104(3), 1282-1286.
- Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23-30.
- Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. (2^a ed.). England: Chapman & Hall.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Houghton, P. J. (2001). Old Yet New-Pharmaceuticals from Plants. *Journal of Chemical Education*, 78(2), 175.
- Huang, D.; Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 1841-1856.



- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Colegio de Posgraduados; Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa y Secretaría del Medio Ambiente. (2009). *Estudio Base para el Manejo de Arbolado Urbano Infestado por Muérdago*. México: Secretaría del Medio Ambiente.
- Investigación y Desarrollo. (2012). *Propiedades anticancerígenas en parásito de ahuejotes*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Jayasri, M. A.; Mathew, L. & Radha, A. (2009). A report on the antioxidant activity of leaves and rhizomes of *Costus pictus* D. Don. *International Journal of Integrative Biology*, 5(2), 20-26.
- Jiménez, R. Duarte, J. & Pérez V., F. (2012). Epicatechin: Endothelial Function and Blood Pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8823-8830.
- Joshi, S. C.; Verma, A. R. & Mathela, C. S. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 37-40.
- Katalinic, V.; Modun, D.; Music, I. & Boban, M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(1), 47-52.
- Kato, M. J. & Furlan, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry*, 79(4), 529-538.
- Khwaja, T. A. (1996). *Pharmaceutical preparations derived from European mistletoe*. USA. Patent Number 5,547,674. University of Southern California.
- Kuijt, J. (1975). The genus *Cladocolea* (Loranthaceae). *Journal Arnold Arboretum*, 56(3), 265-335.
- Kuijt, J. (1992). Two new species of *Cladocolea* (Loranthaceae) from México and Surinam. *Novon*, 2, 351-354.
- Larson, A. R. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27(4), 969-978.



- Li, Y. Q.; Matsunaga, K.; Kato, R. & Ohizumi, Y. (1996). Studies on the structure of isoostelbin. *Journal of Natural Products*, 31(10), 761-763.
- Liu, Z. Q.; Ma, L. P.; Zhou, B.; Yang, L. & Liu, Z. L. (2000). Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids*, 106(1), 53-63.
- López R., R. y Echeverri, F. (2007). ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes?. *Scientia et Technica*, 13(33), 41-44.
- Lotito, S. B. & Frei, B., (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(12), 1727-1746.
- Magalhães, L. M.; Santos, F.; Segundo, M. A.; Reis, S. & Lima, J. F. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441-447.
- Markham, K. R. & Ofman, D. J. (1993). Lisianthus flavonoid pigments and factors influencing their expression in flower colour. *Phytochemistry*, 34(3), 679-685.
- Marwah, R. G.; Fatope, M. O.; Mahrooqi, R. A.; Varma, G. B.; Abadi, H. A.; Khamis, S. & Burtamani, A. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*, 101(2), 465-470.
- Mathew, S. & Abraham, T. E. (2006). *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*, 44(2), 198-206.
- Mattila, P.; Astola, J. & Kumpulainen, J. (2000). Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5834-5841.
- Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577-599.



- Migliore, L. & Coppedè, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative, disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 73-84.
- Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R. & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Mishra, K.; Ojha, H. & Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH[•] assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Molyneux P. (2003). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of science and technology*, 26, 211-219.
- Mosquera M., O. M.; Niño O., J.; Correa, Y. M. & Buitrago B., D. C. (2005). Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica*, 1(27), 231-234.
- Morales C., C. I.; Duran R., G. E.; Zúñiga R., B.; Muñoz O., V.; Herrera S., J. y Guevara F., P. (2010, noviembre). *Estudio de la actividad citotóxica de Cladocolea loniceroides y Struthanthus interruptus (Loranthaceae)*. Comunicación presentada al XVIII Congreso Mexicano de Botánica, Guadalajara, México.
- Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P. & Cillard, J. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*, 45(1), 13-19.
- Murillo, E.; Lombo, O.; Tique, M. y Méndez, J. J. (2007). Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica*, 18(6), 65-73.
- Murray, M.; Birdsall, T.; Pizzorno, J. E. y Reilly, P. (2004). *La Curación del Cáncer, Métodos Naturales*. España: Robinbook.
- Nogué, S.; Simón, J.; Blanché, C. y Piqueras, J. (2009). *Intoxicaciones por plantas y setas*. España: Laboratorios Menarini.



- Oehlke, K.; Heins, A.; Stöckmann, H.; Sönnichsen, F. & Schwarz, K. (2011). New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chemistry*, 124(3), 781-787.
- Organización de las Naciones Unidas. (2013). *Estadísticas sanitarias mundiales 2013*. Suiza: Autor.
- Osman, A. M.; Wong, K. K. Y. & Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 321-329.
- Ozawa, T.; Lilley, T. H. & Haslam E. (1987). Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26, 2937-2942.
- Page, M. M.; Salmon, A. B.; Leiser, S. F.; Robb, E. L.; Brown, M. F.; Milter, R. A. & Stuart, J. A. (2009). Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(8), 1109-1118.
- Park, J. H.; Hyun, C. K. & Shin, H. K. (1999). Cytotoxic effects of the components in heart-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters*, 139(2), 207-213.
- Pérez J., J. & Saura C., F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7), 791-800.
- Ramos, A.; Vizoso, A.; Piloto, J.; García, A.; Rodríguez, C. A. & Rivero, R. (2003). Screening and antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 241-246.
- Raskyn, I.; Ribnicky, D.M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D. A.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J. M.; Cornwell, T.; Pastor, I & Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20(12), 522-531.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.



- Red Social de los Profesionales del Medio Natural. (2010). *El muérdago, planta hemiparásita: ciclo biológico, daños y métodos de control*. España: Unidad Sanidad Forestal.
- Reynoso O., C. A. (1998). *Los antioxidantes en alimentos: perspectivas de aplicación*. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rodríguez C., M. E.; Pérez O., L.; Serrato B., B. E.; Juárez O., M. A.; Mascher, D. & Paredes C., M. C. (2003). Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculathus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 213-218.
- Saavedra R., L. de L.; Cárdenas S., E.; Alvarado R., D.; Estrada V., E.; Equihua M., A. y González M., U. (2006). *Anatomía patológica del muérdago verdadero Cladocolea loniceroides Van Tieghem parásito del ahuejote (Salix bonplandiana)*. México.
- Sandoval C., L. y Gutiérrez, M. V. (2006). Plantas parásitas del arbolado urbano. *ArbóreA*, 8(18-19), 23-32.
- Scott, B. C.; Butler, J.; Halliwell, B. & Aruoma, O. I. (1993). Evaluation of the Antioxidant Actions of Ferulic Acid and Catechins. *Free Radical Research*, 19(4), 241-253.
- Serrano M., M. J. (2010). *Evaluación de la antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de Xochimilco*. Tesis de maestría, División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Serrano M., M. J.; Guerrero L., I.; De la Paz Pérez O., C. y Soriano S., J. (2011). Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kujit (Loranthaceae). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 161.
- Shahidi, F. & Alexander, D. M. (1998). Green tea catechins as inhibitors of oxidation of meat lipids. *Journal of Food Lipids*, 5(2), 125-133.



- Singleton, V. L.; Orthofer, R. & Lamuela Raventós, R. M. (1981). Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Advanced Food Research*, 27, 149-242.
- Sinha, A.; Taylor, W. H.; Khan, I. H.; McDaniel, S. T. & Esko, J. D. (1999). Glycoside primers of *Psittacanthus cucullaris*. *Journal of Natural Products*, 62(7), 1036-1038.
- Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria. (2003). *Enciclopedia de Plantas Medicinales*. España: Promotora de Iniciativas Editoriales.
- Surveswaran, S.; Cai, Y-Z.; Corke, H. & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953.
- Törrönen, R.; Häkkinen, S.; Kärenlampi, S. & Mykkänen, H. (1997). Flavonoid and phenolic acids selected berries. *Cancer Letters*, 114(1-2), 191-192.
- Tovar del R., J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera*. Tesis de licenciatura, Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Trabelsi, N.; Oueslati, S.; Falleh, H.; Waffo-Téguo, P.; Papastamoulis, Y.; Mérillon, J-M.; Abdelly, C. & Ksouri, R. (2012). Isolation of powerfull antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*, 135(3), 1419-1424.
- United States Department of Agriculture. (2002). *Mistletoes of North American Conifers*. (General Technical Report RMRS-GTR-98). USA: Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.
- Wagner, H.; Bladt S. & Zgainski, E. M. (1984). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. USA: Springer.
- Winkel S., B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485-493.
- Wojdylo, A.; Oszmiański, J. & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.



- Wootton-Beard, P.C.; Moran, A. & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224.
- World Health Organization. (2013). *Traditional medicine*. Switzerland: Autor.
- Yanagawa, Y.; Yamamoto, Y.; Hara, Y. & Shimamura, T. (2003). A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Current Microbiology*, 47(3), 244-249.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 64-71.
- Zheng, W. & Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Zhu, K-X.; Lian, C-X.; Guo, X-N.; Peng, W. & Zhou, H-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry*, 126(3), 1122-1126.
- Zuleta, A.; Esteve, M. & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316.