



## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO CITOTÓXICO DE *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae)

## ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CITOTOXIC EFFECT OF *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae)

M.J. Serrano-Maldonado<sup>1</sup>, I. Guerrero-Legarreta<sup>1</sup>, C. De la Paz Pérez-Olvera<sup>2</sup> y J. Soriano-Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, <sup>2</sup>Departamento de Biología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Col. Vicentina, Ap. P. 55-535, Deleg. Iztapalapa, CP. 09340, México, D.F., México.

Recibido 11 de Enero 2011; Aceptado 18 de Abril 2011

### Resumen

*Cladocolea loniceroides* es un muérdago endémico de México que causa pérdidas económicas. Para encontrarle una utilidad, el objetivo de este trabajo fue evaluar los polifenoles, especialmente los flavonoides, en extractos acuosos y metanólicos de hojas, frutos y tallos, así como su actividad antioxidante (AAOx) evaluada como % de inhibición del DPPH• (radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazilo). Esto mediante la cuantificación de malondialdehído producido por la peroxidación lipídica en suero de ratas, inducida con 85 mg/k de peso de Fe-dextran intraperitonealmente. Se evaluó el efecto citotóxico de los polifenoles en cultivo celular de cáncer de mama ZR-75-1, que se determinó por su valor CL<sub>50</sub> (concentración de extracto necesaria para obtener 50% de muerte celular). Los polifenoles totales resultaron (mg eq. AG): fruto>hoja>tallo (189.5±4.9; 93.33±0.9 y 74.5±4.2, respectivamente). La AAOx de extractos acuosos o metanólicos de hojas, frutos y tallos se debe principalmente a los polifenoles y a su capacidad quelante. El extracto acuoso del fruto (82.6 ± 0.4% de inhibición DPPH•; IC<sub>50</sub>=0.39 mg eq. AG/g de fruto seco y con capacidad quelante al Fe<sup>2+</sup>) administrado en una concentración 0.77 mM eq. AG inhibió la peroxidación lipídica *in vivo*. El efecto citotóxico se observó a una CL<sub>50</sub>=0.091 mg eq. AG/mL.

**Palabras clave:** *Cladocolea loniceroides*, polifenoles, actividad antioxidante, efecto citotóxico, CL<sub>50</sub>.

### Abstract

*Cladocolea loniceroides* is an endemic mistletoe to Mexico which causes economic losses. In order to find out its usefulness, the objective of this work was to assess polyphenols, especially flavonoids, as obtained of aqueous and methanolic extraction of leaf, fruit and stalk, as well as its antioxidant activity (AOxA), which was assessed as % of DPPH• (1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl) inhibition. AOxA was also evaluated through the malondialdehyde content produced by the lipid peroxidation, induced by intraperitoneal injection of iron-dextran, into rat blood serum. The polyphenols cytotoxic effect was evaluated on the cellular line ZR-75-1 of breast cancer, which was determined through its LC<sub>50</sub> value (extract concentration that provides 50% of cellular death). Total polyphenols assessed were (mg eq. GA): fruit>leaf>stalk (189.5 ± 4.9; 93.33± 0.9 y 74.5 ± 4.2, respectively). AOxA of aqueous and methanolic extractions of leaf, fruit and stalk is a consequence of the chelating capacity of polyphenols. The aqueous extract of the fruit (82.6 ± 0.4% DPPH• inhibition; IC<sub>50</sub>= 0.39 mg eq. GA/g dry fruit and Fe<sup>2+</sup> chelating capacity) administered at 0.77 mM eq. GA managed to inhibit the lipid peroxidation *in vivo*. The cytotoxic effect was observed at a LC<sub>50</sub>=0.09 mg eq. GA/mL).

**Keywords:** *Cladocolea loniceroides*, polyphenols, antioxidant activity, cytotoxic effect, LC<sub>50</sub>.

\*Autor para la correspondencia. E-mail: jss@xanum.uam.mx

## 1 Introducción

El muérdago es una especie vegetal parásita de árboles que se nutre a través de órganos invasores llamados haustorios, los cuales penetran para formar interconexiones firmes con el tejido vascular del hospedero, a través del cual este parásito obtiene sus nutrientes y agua, lo que le ocasiona una muerte lenta (Azuma y col., 2000). Esta infestación afecta en forma directa la producción maderera y frutícola del país. Por otro lado, esta 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-Villamil y col., 2005; De la Paz Pérez y Ceja, 2005).

*Cladocolea loniceroides*, una de las 19 especies de este género, pertenece a la familia de las Loranthaceae que parasitan severamente, entre otros, a miembros del género *Salix* como el ahuejote (*Salix bonplandiana*) distribuido en la zona Chinampera de Xochimilco y en al menos 11 estados de la República Mexicana (Alvarado-Rosales y Saavedra-Romero, 2005). Puesto que no existe un control químico eficaz de la infestación – las ramas invadidas se cortan y se apilan a la intemperie representando un foco de contaminación – es preciso encontrar alguna forma de aprovechamiento y procesamiento de estos residuos. En este sentido Morales-Carballo y col. (2010) han reportado un débil efecto citotóxico en *Artemia salina* del extracto metanólico del tallo de *C. loniceroides* atribuyendo este efecto a su contenido de flavonoides. Mientras que en un extracto similar Durán-Rodríguez y col. (2010) observaron un efecto antimicrobiano que asociaron al contenido de metabolitos secundarios de polaridad alta. Por otra parte, 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, especialmente el cáncer de mama; en el control de epilepsia, desórdenes nerviosos, delirio, asma, hipertensión, dolor de cabeza y dermatitis. (Khwaja, 1996; Tabiasco y col., 2002; Önay-Uçar y col., 2006; Pryme, 2009). Este efecto bioactivo es atribuido a viscotoxinas, lectinas y alcaloides (pues se han observado efectos antiproliferativo e inmunomodulador) los cuales pueden reducir efectos mutagénicos atribuibles a los radicales libres de diferentes especies de oxígeno (Önay-Uçar y col., 2006; Urech y col., 2007).

Xochimilco, como patrimonio de la humanidad desde la declaración de la UNESCO en 1987, debe

conservar sus características particulares de paisaje y cultivos heredados desde épocas precolombinas. El paisaje se mantiene gracias a los ahuejotes que sostienen con sus raíces a las chinampas, y proporcionan estabilidad para el cultivo de hortalizas y flores de la zona. Por lo tanto es necesario conservar las chinampas y asegurar una de las principales actividades económicas de sus habitantes: el turismo. El muérdago podría ser fuente de compuestos bioactivos, coadyuvante en el tratamiento de algunas enfermedades crónico degenerativas. El descubrimiento de estas propiedades resulta interesante y útil particularmente como fuente de AOx naturales, alimentos funcionales y nutracéuticos (Miliauskas y col., 2004). El perfil de la composición química de la planta junto con el conocimiento de su actividad antioxidante (AAOx) puede proporcionar una estimación de su potencial terapéutico (Akinnmoladun y col., 2007). Así, dada la disponibilidad de residuos de muérdago que podrían procesarse para obtener productos de valor agregado con actividad biológica, el objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración de polifenoles totales y flavonoides de diferentes extractos de hojas, frutos y tallos de *C. loniceroides*, así como su actividad antioxidante en un sistema de óxido-reducción y a través de la cuantificación de malondialdehído producido por la peroxidación lipídica de ácidos grasos contenidos en suero de ratas. También se evaluó el efecto citotóxico *in vitro* de los polifenoles y flavonoides en un cultivo de células de cáncer de mama.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Muérdago

*C. loniceroides* fructificado se recolectó de *S. bonplandiana* infestados, en tres colectas independientes (muestreo simple aleatorio; Proctor y Meullenet, 2003), los cuales se hallaron en la zona del embarcadero “Nuevo Nativitas”, Xochimilco, México ( $19^{\circ} 14' N$ ,  $99^{\circ} 05' O$ , altitud 2273 m) durante el mes de febrero de 2009. La identificación se realizó por el Dr. Miguel Cházaro Bazánez de la Universidad de Guadalajara y se depositó en el herbario Metropolitano de la Universidad Autónoma Metropolitana en su Unidad Iztapalapa “Dr. Ramón Riba y Nava Esparza” con el voucher no. 66828. El fruto se encontraba maduro de color rojo característico del estado de madurez de este muérdago. Se lavó y desinfectó,

sumergiendo las ramas durante 1 h con solución de NaClO al 0.5%; posteriormente las hojas, tallos y frutos se secaron por separado a temperatura ambiente. Una vez secos se molieron los materiales haciéndolos pasar por un tamiz hasta obtener un tamaño de partícula de 420 µm (Quezada y Santa Cruz, 2001). En el caso del fruto, debido a que contiene mucílago, no fue posible molerlo pues al hacerlo se obtuvo una pasta en lugar de una harina. Las harinas de tallo y hoja se guardaron en frascos de vidrio ámbar perfectamente cerrados y se mantuvieron en refrigeración a 5°C hasta su análisis. La pasta del fruto se utilizó de inmediato.

## 2.2 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal se llevó a cabo siguiendo los procedimientos de la AOAC (2000) incluyendo humedad, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda. La concentración de carbohidratos se calculó por diferencia. Todos los análisis de esta investigación se realizaron por triplicado.

## 2.3 Evaluación de polifenoles totales y flavonoides

La solubilización de los polifenoles de cada muestra deshidratada se llevó a cabo mediante una extracción con metanol de acuerdo a la metodología propuesta por Miliauskas y col., (2004). En breve: 0.5 g de muestra seca se mezclaron con 10 mL de metanol manteniéndose en agitación por 1 h; este paso se repitió dos veces. Posteriormente, cada extracto se centrifugó a 805 x g y se combinaron los sobrenadantes.

Debido a que el extracto será aplicado en humanos, se procedió a obtener una infusión con 0.5 g de la muestra seca en 25 mL de agua desionizada, dejando ebullicir durante 5 min. Una vez fría, se filtró sobre gasa y se centrifugó a 805 x g por 5 min.

La cuantificación de polifenoles totales, se llevó a cabo con el reactivo de Folin-Ciocalteau, de acuerdo al método de Singleton y col., (1999). La mezcla de reacción se formó con 500 µL del extracto diluido con 4.5 mL de agua desionizada; se agregaron 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y 500 µL de solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; después de agitar los tubos con un Vortex, se adicionaron 4.3 mL de agua desionizada. La absorbencia se determinó a 765 nm en un espectrofotómetro (Genesys UV 10) después de que la mezcla de reacción se mantuvo durante 1 h en la oscuridad. El contenido total de polifenoles se calculó en mg equivalentes de ácido gálico (mg eq. AG), para

lo cual se construyó una curva de calibración de 25 a 200 ppm de AG.

Los flavonoides se cuantificaron de acuerdo con el método de García-Nava (2007) y se utilizó rutina (Sigma) como compuesto de referencia. Se tomaron 100 µL del extracto y se le agregaron 1250 µL de agua desionizada; se mezcló con 75 µL de NaNO<sub>2</sub> al 5%; después de reposar 6 min, se adicionaron 150 µL de AlCl<sub>3</sub> al 10% dejando reposar por 5 min. Posteriormente se adicionaron 500 µL de NaOH 1 M y 425 µL de agua desionizada. La absorbencia se determinó inmediatamente a 510 nm.

## 2.4 Actividad antioxidante

### 2.4.1 Reducción del DPPH<sup>•</sup>

El radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) en su forma radical tiene color púrpura con absorbencia máxima a 517 nm. En su forma reducida, después de la acción de un antioxidante sobre el radical, la disolución se torna a color amarillo. El cambio de coloración de este compuesto se monitoreó para determinar la concentración de las especies reductoras contenidas en los diferentes extractos (Brand-Williams y col., 1995). La evaluación de la reducción del DPPH<sup>•</sup> se llevó a cabo como lo reporta Moraes-de-Souza y col. (2008) y se utilizó una disolución de vitamina E (0.01% p/v) como control. La actividad antioxidante se expresó como el porcentaje de inhibición de la reducción del DPPH<sup>•</sup> de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[ \frac{A_{C(0)} - A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$A_{C(0)}$  = Absorbencia del DPPH en su forma radical (control negativo)

$A_{A(t)}$  = Absorbencia de DPPH con muestra después de 45 min de reacción

Se calculó el valor  $IC_{50}$  que se define como la concentración de extracto en mg equivalentes de AG/g de muestra que se requiere para inhibir la reducción del 50% de radicales libres DPPH<sup>•</sup> bajo las condiciones de análisis. El valor se obtuvo por regresión lineal del porcentaje de inhibición versus concentración del extracto (Tovar-Pérez y col., 2009).

## 2.5 Actividad quelante de Fe<sup>2+</sup>

El Fe<sup>2+</sup> forma un complejo con ferrozina de color púrpura que tiene una absorbencia máxima a 562

nm. En presencia de un antioxidante, el Fe<sup>2+</sup> puede quelarse y la intensidad del color púrpura del complejo con ferrozina disminuye proporcionalmente a la concentración del antioxidante en la muestra de interés (Xie y col., 2008).

Se mezcló 1 mL de muestra con 50 μL de FeCl<sub>2</sub> 2 mM y 1.85 mL de agua destilada. Después se agregaron 100 μL de solución de ferrozina 5mM; se dejó reposar por 10 min a T amb. y se determinó la absorbancia a 562 nm. El porcentaje de quelación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Quelación} = \left[ \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

## 2.6 Actividad antioxidant in vivo

Sólo se evaluó la actividad antioxidant del extracto acuoso del fruto (EAF) de *C. loniceroides* por su mayor contenido de flavonoides y porque la extracción se realizó en medio acuoso, puesto que se desearía administrarlo en humanos. Para la evaluación de la actividad antioxidant se tomó como modelo biológico a ratas con peroxidación lipídica inducida. El Fe<sup>2+</sup> y el Fe<sup>3+</sup> se requieren para la catálisis de la peroxidación lipídica a través de la llamada reacción de Fenton que genera especies reactivas de oxígeno o radicales libres que dañan a los lípidos de la membrana celular (Morales y col., 2009). En este ensayo se evaluó el efecto de los radicales libres sobre la peroxidación lipídica que se indujo por inyecciones intraperitoneales de Fe-dextran *in vivo* cuantificando el malondialdehído (MDA) producido, después de 192 h de ensayo, como consecuencia de la descomposición de los hidroperóxidos producidos por la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. El MDA forma un cromóforo con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) que se le conoce como sustancias reactivas al TBA (TBARS). Se adaptó el método utilizado por El-Haffidi y Baños (1997) de la siguiente manera: se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de cuatro meses y se distribuyeron en cinco grupos (Fig. 1). El grupo A o control positivo estuvo formado por ratas con peroxidación lipídica inducida intraperitonealmente con Fe-dextran; Grupo B o control negativo consistió en ratas con alimentación habitual; Grupo C formado por ratas con administración intraperitoneal de Dextran-500; Grupo D ratas con peroxidación lipídica inducida y administración *ad libitum* de EAF (0.77 mM eq. AG) y Grupo E mismo tratamiento anterior excepto que la concentración de EAF fue de 1.55 mM eq. de AG. Los Grupos A y B

no recibieron EAF. En los Grupos A, D y E se indujo la peroxidación lipídica a través de la administración de 85 mg de Fe-dextran/k de peso vía intraperitoneal a través de diferentes dosis distribuidas de la siguiente manera (mg de Fe-dextran/ k de peso): al inicio 10, 25 a las 24 h y 50 a las 48 h. En el Grupo C sólo se administró Dextran-500 en los mismos tiempos que en A, D y E.

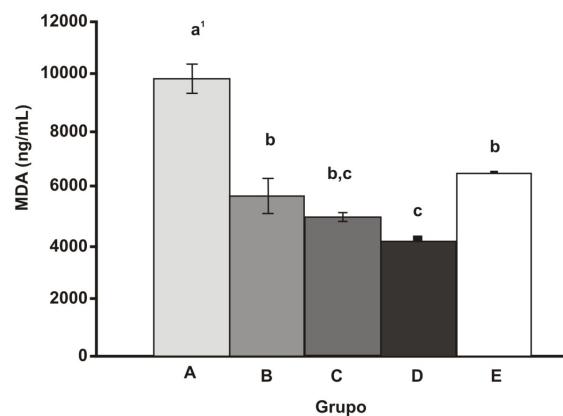


Fig. 1. Presencia de malondialdehído en suero de ratas con peroxidación lipídica inducida con Fe-dextran . (A) control positivo, ratas con peroxidación lipídica inducida intraperitonealmente con Fe-dextran; (B) control negativo, ratas con alimentación habitual; (C) ratas con administración intraperitoneal de dextran-500; (D) ratas con peroxidación lipídica inducida por Fe-dextran y administración *ad libitum* de EAF (0.77 mM eq. AG); (E) ratas con peroxidación lipídica inducida por Fe-dextran y administración *ad libitum* de EAF (1.55 mM eq. AG). <sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

### 2.6.1 Actividad de TBARS

La AAOx se evaluó por medio del registro de la concentración del malondialdehído en suero al final del tratamiento. Las ratas se sacrificaron por decapitación después de 24 h de finalizado el experimento; se recolectó la sangre en tubos heparinizados mantenidos a 4°C; posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 447 x g durante 20 min a 4°C.

Para determinar la concentración del malondialdehído se utilizaron 100 μL de suero a los que se adicionaron 1 mL de buffer de fosfatos 150 mM a pH 7.4; 1 mL de ácido acético al 20% a pH 2.5 y 1.5 mL de TBA al 0.8%; la mezcla de reacción se llevó a baño María durante 1 h; la reacción se detuvo

enfriando la mezcla en baño de hielo. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de n-butanol con agitación en Vortex; la mezcla se centrifugó a 358 x g a temperatura ambiente durante 2 min y el sobrenadante se recuperó para analizarse por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El cromóforo, resultado de la reacción entre el MDA y el TBA, con un tiempo de retención de 2.3 min se registró a 532 nm en un HPLC (Waters 996 PDA HPLC System) adaptado con una columna Resolve C<sub>18</sub> (150 x 3.9 mm), la cual se equilibró con una mezcla de buffer de fosfatos 50 mM a pH 6.8 y metanol (70:30). Se inyectaron 5 µL del sobrenadante y las muestras se eluyeron con un flujo de 0.8 mL/min bajo condiciones isocráticas. La curva estándar se construyó con tetraetoxipropano (0-388 µg/mL) siguiendo la técnica descrita anteriormente. El valor de la AAO<sub>X</sub> se expresó como mg equivalentes de MDA (TBARS) por mL de suero.

## 2.7 Efecto citotóxico

El efecto citotóxico del EAF se evaluó en un cultivo celular de la línea ZR-75-1 de cáncer de mama ductal humano, siguiendo la metodología de García-Gasca y col. (2002). Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) enriquecido con 10% de suero fetal bovino en cajas de 6 mm con 4 mL de medio a 36°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

Para la evaluación del efecto citotóxico se sembraron 30,000 células por pozo en placas de 24 pozos. Después de 48 h se realizó el cambio de medio de cultivo, reemplazando el suero fetal bovino por albúmina sérica bovina al 0.5% en el medio DMEM, conteniendo el EAF a 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 mg eq. AG/mL de medio de cultivo. Después de 24 h del tratamiento con EAF, se realizó el conteo directo de células en una cámara de Neubauer. Posteriormente, se determinó el valor CL<sub>50</sub> (concentración de extracto necesaria para obtener 50% de muerte celular) que se

obtuvo de la linearización de la curva dosis-respuesta.

### 2.7.1 Análisis estadístico

A los resultados se aplicó una prueba de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia p<0.05 (SAS, 1996).

## 3 Resultados y discusión

### 3.1 Análisis químico proximal

En el Cuadro 1 se muestra el análisis de hoja, tallo y fruto. No se tienen reportes previos del análisis químico proximal de *C. loniceroides*. Sin embargo análisis químicos realizados a *V. album* en diferentes estados de desarrollo de la planta completa (Derya-Umucalilar y col., 2007) mostraron contenidos de proteína cruda (5.3 a 6.9%); fibra (2.9 a 3.1%); extracto etéreo (6.9 a 7.4%) y cenizas (7.9 a 12.8%). En todos los casos los contenidos de nutrientes son más altos en las diferentes secciones de *C. loniceroides*, excepto en el contenido de cenizas donde la concentración en hoja y fruto fue baja. Urnes (1969) encontró en muérdagos de Arizona, *Phoradendron* sp. y *Arceuthobium* sp., contenidos de proteína cruda de 15 a 25%. El fruto produce un mucílago llamado viscina, que le permite adherirse al árbol hospedero para comenzar su desarrollo, que en *V. album* está compuesto por celulosa en una mezcla de polisacáridos ácidos y neutros llamado viscano, el cual es soluble en agua (Azuma y col., 2000). Sin embargo, la sustancia mucilaginosa encontrada en los frutos de *C. loniceroides*, fue muy soluble en éter etílico, por lo que elevó la concentración del extracto etéreo. Lo anterior mostró que los compuestos solubilizados fueron apolares contrariamente a lo esperado para la viscina de naturaleza polar.

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

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

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

Cuadro 2. Polifenoles totales en los extractos acuosos (EA) y metanólicos (EM) de diferentes secciones de *C. loniceroides*: hoja (H), tallo (T) y fruto (F).

Sección/disolvente	Polifenoles totales (mg eq. AG/g)	Flavonoides (mg eq. rutina/g)
EAH	93.3 ± 0.9 <sup>c1</sup>	8.26± 0.33 <sup>d</sup>
EMH	26.3 ± 0.9 <sup>e</sup>	3.78± 0.15 <sup>e</sup>
EAT	120.3 ± 9.0 <sup>b</sup>	9.19± 0.27 <sup>c</sup>
EMT	31.4 ± 0.4 <sup>e</sup>	3.69± 0.21 <sup>e</sup>
EAF	74.5 ± 4.2 <sup>d</sup>	14.21± 0.37 <sup>b</sup>
EMF	189.5 ± 4 <sup>a</sup>	36.45± 0.54 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos (EA) y metanólicos (EM) de hoja (H), tallo (T) y fruto (F) de *C. loniceroides*.

Muestra	% inhibición DPPHo	IC <sub>50</sub> (mg eq. AG/mL)
EAH	77.4 ± 0.5 <sup>c,d1</sup>	0.12
EAT	84.8 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	0.81
EAF	82.6 ± 0.4 <sup>b,c</sup>	0.39
EMH	83.4 ± 1.7 <sup>b</sup>	2.15
EMT	90.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.07
EMF	83.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.04
Vitamina E	89.9± 1.0 <sup>a</sup>	7.30 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

<sup>2</sup> µg/mL

### 3.2 Contenido de polifenoles totales

En el Cuadro 2 se muestra la concentración de polifenoles totales de las extracciones acuosas (EA) y metanólicas (EM) de materiales deshidratados de hoja, tallo y frutos. La EM del fruto contiene la mayor concentración de polifenoles totales, seguida de la extracción acuosa del tallo y hoja. En términos generales en el tallo y hoja los polifenoles fueron muy polares ya que el agua fue capaz de extraer una mayor cantidad, mientras que en el fruto hay una mayor cantidad de polifenoles menos polares. Ademiluyi y Oboh (2008) han reportado concentraciones muy bajas de polifenoles totales (160 a 180 mg/100 g) en extractos metanólicos de hojas de *V. album*, la diferencia puede deberse a que utilizaron ácido tánico en lugar de ácido gálico para expresar la concentración de estos compuestos.

El mismo comportamiento que se describió para los polifenoles, se observó al comparar el contenido de flavonoides. En EA de tallo y hojas se encontró mayor concentración de flavonoides mientras que en el fruto el EM contiene mayor concentración de flavonoides ( $p<0.05$ ). La concentración de flavonoides fue relativamente baja en comparación con la cantidad

de polifenoles totales en cada sección de la planta, por lo que los polifenoles deben consistir de otras familias de compuestos fenólicos. Durán y col. (2010) realizaron pruebas cualitativas de polifenoles y mencionan que los compuestos bioactivos de *C. loniceroides* están integrados por antraquinonas, saponinas, taninos, alcaloides y lectinas, mientras que Morales y col. (2010), también con análisis cualitativos, hacen referencia en esta especie a otros metabolitos secundarios como terpenos, flavonoides y glucósidos. A diferencia de estos autores quienes consideran a los flavonoides como los principales polifenoles, en este trabajo, el contenido observado fue bajo. En un estudio comparativo, se evaluó el contenido de ácidos fenólicos de varias especies de muérdago que infestan diferentes árboles, se observó que la cantidad y contenido de polifenoles depende del hospedero. En cada planta de muérdago se encontraron en promedio entre 12 y 15 polifenoles, lográndose detectar hasta 21 fenoles diferentes en su forma glucosídica o de aglicón, por lo que *C. loniceroides* podría ser una fuente importante de antioxidantes naturales (Chen y col., 2004; Wolfe y Hai, 2007; Luczkiewicz y col., 2001).

### 3.3 Actividad antioxidante

Cuando se evaluó la actividad antioxidante, expresado en porcentaje de inhibición de DPPH<sup>•</sup>, de los diferentes EA y EM de hoja, tallo y fruto de *C. loniceroides* (Cuadro 3) se observó que los EAT y EMT tuvieron AAOx significativamente superior al resto de los extractos ( $p < 0.05$ ) y similar a la AAOx de un estándar de Vitamina E. El EMT presentó el menor IC<sub>50</sub> de todos los extractos ensayados, lo cual mostró su gran AAOx. En términos generales los EM y EA de H, T y F tuvieron buena AAOx puesto que a concentraciones pequeñas (0.07-0.81 mg eq. de AG/mL) inhiben el 50% de los radicales DPPH<sup>•</sup>. Sin embargo los EMH y EMF, a pesar de tener alrededor del 83 % de inhibición de DPPH<sup>•</sup>, observaron valores de IC<sub>50</sub> un orden de magnitud mayor que el resto de los extractos pero de dos órdenes de magnitud con respecto a la Vitamina E, por lo cual resultarían menos eficaces al aplicarse en un sistema de óxido-reducción. Önay-Uçar y col. (2006) informaron que extractos metanólicos de hojas de *V. album* ssp. *album* mostraron del 59 a 95 % de inhibición de DPPH<sup>•</sup>, incluso mayor que la vitamina E y 3-ter-butil-4-hidroxianisol que utilizaron como controles. Los porcentajes de inhibición de DPPH<sup>•</sup> para extractos metanólicos de diversas plantas medicinales y aromáticas van de 7 al 94% por lo que los extractos de H, T y F de *C. loniceroides* poseen una excelente AAOx (> 77%), aunque sus valores de IC<sub>50</sub> fueron de un orden de magnitud mayor que antioxidantes como ácido ascórbico, vitamina E, querctina, ácido ferúlico, etc. (IC<sub>50</sub> = 4 – 31  $\mu$ g/mL; Miliauskas y col., 2004).

### 3.4 Actividad quelante de Fe<sup>2+</sup>

Evaluar la capacidad quelante sobre iones metálicos es de suma importancia debido a que los metales, especialmente el Fe<sup>2+</sup>, son capaces de iniciar las reacciones de peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados y algunos polifenoles poseen la capacidad de quelar diferentes iones metálicos con lo que evitan el deterioro de los lípidos. Para este fin se midió la actividad quelante de los extractos de muérdago dependiente de la concentración de polifenoles totales (0-20 mg eq. AG/mL), de la misma manera que lo realiza el EDTA (0-20 mg eq. AG/mL) que se utilizó como quelante de referencia. Sin embargo, los extractos requirieron concentraciones de un orden de magnitud superior al EDTA para tener un efecto similar. A 20  $\mu$ g/mL de EDTA se obtuvo el 90%

de quelación de Fe<sup>2+</sup>, pero para obtener el 80% de quelación se requirieron 20 mg eq. de AG/mL de extracto. Ademiluyi y Oboh (2008) encontraron del 60 al 75% de quelación Fe<sup>2+</sup> en extractos metanólicos de hojas de *V. album* (10 mg/mL).

### 3.5 Actividad antioxidante *in vivo*

Por la capacidad que mostraron los diferentes extractos de H, T y F de quesar el Fe<sup>2+</sup>, se utilizaron ratas a las que se les indujo la peroxidación lipídica a través de la administración gradual de este metal. Para este propósito se descartaron los extractos metanólicos (por ser un disolvente tóxico) por lo que en el ensayo se utilizó el EAF ya que contenía la mayor cantidad de flavonoides, de los extractos acuosos analizados. El Fe<sup>2+</sup> cataliza la etapa inicial de la autoxidación de lípidos y produce malondialdehído como producto de descomposición de los hidroperóxidos, por lo que el malondialdehído es un excelente metabolito marcador para la evaluación de la AAOx. En la Fig. 1 se observa que la administración *ad libitum* del EAF (0.77 ó 1.55 mM eq. de AG; Grupos D y E) inhibió la peroxidación lipídica ( $p < 0.05$ ); se observó que la administración de Fe<sup>2+</sup> no logró inducir la autoxidación de los ácidos grasos insaturados más allá de lo que se produce con una dieta habitual (Grupo B). Al parecer una concentración menor de polifenoles del EAF (Grupo D) tiene mayor capacidad de quesar el Fe<sup>2+</sup> que una concentración mayor (Grupo E). El EAF mostró una excelente AAOx en el modelo biológico utilizado y esta actividad es la consecuencia no sólo de la capacidad quelante de Fe<sup>2+</sup>, sino también de su gran capacidad reductora. En el laboratorio se realizó un estudio comparativo de la AAOx de todos los extractos de *C. loniceroides* en diferentes sistemas de óxido-reducción (resultados no mostrados) concluyéndose que contienen compuestos que actúan como antioxidantes primarios y/o secundarios, lo cual refuerza la observación de la gran capacidad de inhibición *in vivo* de la peroxidación lipídica.

### 3.6 Efecto citotóxico

Braun y col. (2001) han reportado que extractos acuosos estandarizados de *V. album* han sido utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico degenerativas, entre ellas el cáncer de mama. En este estudio se evaluó el efecto citotóxico del EAF sobre la línea celular ZR-75-1 de cáncer de mama ductal humano. En la Fig. 2 se muestra el efecto citotóxico sobre este cultivo celular

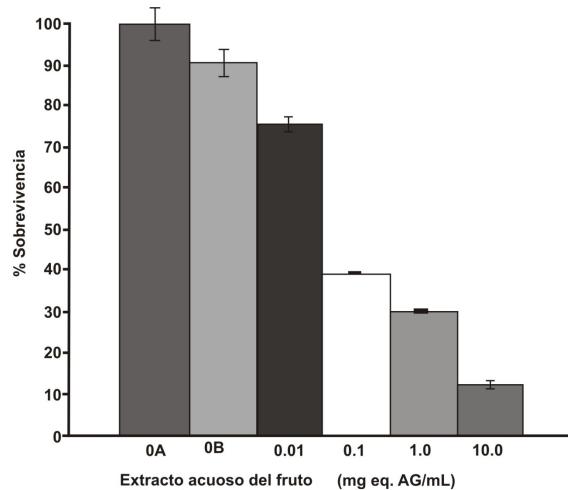


Fig. 2. Efecto citotóxico *in vitro* del extracto acuoso del fruto de *C. loniceroides* sobre células ZR-75-1 de cáncer de mama ductal humano. (0A) control, células en medio enriquecido con suero fetal bovino; (0B) control, células en medio enriquecido con albúmina sérica bovina; 0.1-10.0 concentraciones de extracto acuoso del fruto.

y se observa que las concentraciones de extracto utilizadas (0.01-10 mg eq. de AG/mL) tienen un efecto letal sobre esas células cancerosas. La muerte celular se presentó desde la concentración más baja de EAF y el valor  $CL_{50}$  fue de 0.091 mg eq. AG/mL de medio de cultivo. El efecto letal puede relacionarse principalmente a la excelente AAOx que tiene *C. loniceroides*. La lectina-I  $\beta$ -galactósido específico de muérdago es uno de los constituyentes de los extractos de uso clínico por sus acciones immunomoduladora y antimetastásica probadas (Beuth, 1997; Braun y col., 2001). Sin embargo, en este estudio no se encontró la presencia de proteínas hidrosolubles (albúminas) en los extractos, por lo que se descartó la presencia de viscotoxinas y lectinas como componentes principales (ya que en *V. album* se les atribuye la actividad biológica). Azuma y col. (2000) encontraron que el mucílago contiene un polisacárido conocido como viscano, el cual es soluble en agua y esencialmente libre de proteína, lo que concuerda con este estudio donde sólo se ensayó un extracto acuoso del fruto. Al parecer la mayoría de proteínas del muérdago son solubles en soluciones salinas (globulinas; Pryme, 2009). También se ha mencionado que los compuestos biológicamente activos pueden transferirse del hospedero a la planta parásita y como resultado la actividad biológica de la segunda puede diferir, por ejemplo las propiedades inductoras de

apoptosis así como los compuestos anticancerosos de extractos estandarizados comerciales como Iscador y Helixor de *V. album* son dependientes del hospedero (Önay-Uçar y col., 2006; Urech y col., 2007). El extracto acuoso del fruto de *C. loniceroides* podría utilizarse para la obtención de una preparación comercial que contribuya al tratamiento de cáncer de mama y de esta manera procesar los residuos para disminuir este foco de contaminación de la zona.

## Conclusión

El muérdago *C. loniceroides* que infesta a los ahuejotes de la zona chinampera de Xochimilco es una fuente para la obtención de extractos que contienen polifenoles. La actividad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos de hojas, tallos y frutos se debe principalmente a los polifenoles que fueron cuantificados y a su capacidad de quelación del  $Fe^{2+}$ , los cuales le confieren en parte el efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama ductal. Particularmente el extracto acuoso del fruto tuvo la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, que se indujo por inyección intraperitoneal de Fe-dextran, de los triglicéridos contenidos en suero de ratas que ingirieron el extracto acuoso *ad libitum*.

## Nomenclatura

$A_{C(0)}$	absorbencia del control negativo en el momento de preparación de la disolución.
$A_{A(t)}$	absorbencia de la muestra después de 45 min de reacción.
$A_{control}$	absorbencia de la disolución inicial de ferrozina.
$A_{muestra}$	absorbencia de la mezcla de reacción que contiene la muestra después de 10 min.

## Referencias

- Ademiluyi, A. O. y Oboh G. (2008). Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoe (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 7, 3138-3142.
- Akinmoladun, A., Ibukun, E. y Farombi, E. (2007). Chemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia boonei*. *African Journal of Biotechnology* 6, 1197-1201.

- Alvarado-Rosales, D. y Saavedra-Romero, L. (2005). El género *Cladocolea* (Loranthaceae) en México: Muérdago verdadero o injerto. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 11, 5-9.
- A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists.
- Azuma, J., Kim, N., Heux, L., Vuong, R. y Chanzy, H. (2000). The cellulose system in viscin from mistletoe berries. *Cellulose* 7, 3-19.
- Beuth, J. (1997). Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs* 1, S53-S55.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie* 28, 25-30.
- Braun, J. M., Ko, H. L., Schierholz, J. M., Weir, D., Blackwell, C. c. y Beuth, J. (2001). Application of standardized mistletoe extracts augment immune response and down regulates metastatic organ colonization in murine models. *Cancer Letters* 170, 25-31.
- Camacho-Luis, A., Mendoza-Pérez, J. (2009). La naturaleza efímera de los radicales libres. Química y bioquímica de los radicales libres. En: *Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas*, (J. Morales-González, A. Fernández-Sánchez, M. Bautista-Ávila, N. Vargas-Mendoza y E. Madrigal-Santillán, eds.), Pp. 27-76. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Chen, I., Chang, H., Yang, H. y Chen, G. (2004). Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in microplates. *Journal of Food and Drug Analysis* 12, 29-33.
- Cid-Villamil, R., Ponce S. y Engleman, M. (2005). Germination of *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae). 17-23 julio. Viena, Austria: XVII International Botanical Congress.
- De la Paz-Pérez, C. y Ceja, J. (2005). Branches anatomy of *Fraxinus uhdei* (Wenzing) Lingelsheim and *Prunus persica* Batsch. infected by *Cladocolea* spp. (Mistletoe). 17-23 Julio. Viena, Austria: XVII International Botanical Congress.
- Derya-Umucuları, D. H., Gülsen, N., Coskun, B., Hayırli, A. y Dural, H. (2007) Nutrient composition of mistletoe (*Viscum album*) and its nutritive value for ruminant animals. *Agroforest System* 71, 77-87.
- Durán-Rodríguez, G. E., Zúñiga-Ruiz, B., Muñoz-Ocoto, V., Herrera-Santoyo, J., Guevara-Fefer, P. y Pérez Amador, M. C. (2010). *Cladocolea loniceroides* (Loranthaceae), hemiparásita con actividad antimicrobiana. 21-27 noviembre. Guadalajara, México. XVIII Congreso Mexicano de Botánica.
- El-Haffidi, M. y Baños, G. (1997). *in vivo* plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension* 30, 624-628.
- García-Gasca, T., Salazar-Olivo, L., Mendiola-Olaya, E y Blanco-Labra, A. (2002). The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on *in vitro* cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in vitro* 16, 229-233.
- García-Nava, M. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro*. [http://www.uaq.mx/investigación/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava](http://www.uaq.mx/investigación/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava)
- Gedalovich-Shedletzky, E., Delmer, D. P. y Kuijt, J. (1988). Chemical composition of viscin mucilage from three mistletoe species. A comparison. *Annals of Botany* 64, 249-252.
- Khwaja, T.A. (1996). Pharmaceutical preparations derived from European mistletoe. U.S. Patent 5, 547-674.
- Luczkiewicz, M., Cisowski, W., Kaiser, P., Ochocka, R. y Piotrowski, A. (2001). Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 5, 373-379.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. y Van Beek, T. (2004). Screening of radical scavenging activity

- of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85, 231-237.
- Moraes-de-Souza, R., Oldoni, T., Regitano-d'Arce, M. y Alencar, S. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6, 41-47.
- Morales-Carballo, C. I., Durán-Rodríguez, G. E., Zúñiga-Ruiz, B., Muñoz-Ocoteo, V., Herrera-Santoyo, J. y Guevara-Fefer, P. (2010). Estudio de la actividad citotóxica de *Cladocolea loniceroidea* y *Struthanthus interruptus* (Loranthaceae). 21-27 noviembre. Guadalajara, México. *XVIII Congreso Mexicano de Botánica*.
- Önay-Uçar, E., Karagöz, A. y Arda, N. (2006). Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia* 77, 556-560.
- Proctor, A. y Meullenet, J. (2003). Sampling and sample preparation. En: *Food Analysis*, (S. S. Nielsen, ed.), Pp. 66-80. Springer, New York.
- Pryme, I. (2009). Orally ingestible preparation of mistletoe lectins and method. U.S. Patent. 7,550,159.
- Quezada, J. y Santa Cruz, M. (2001). Evaluación de la respuesta de la *Begonia rex* a la variación de medios y reguladores de crecimiento en técnicas de cultivo de hojas *in vitro*. *Bioquímica y Farmacia de Bolivia* 9, 79-84.
- SAS. (1996). SAS/STAT Software: Release 6.11 SAS Inst. Inc. Cary, NC.
- Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Tabiasco, J., Pont, F., Fournié, J. y Vercellone, A. (2002). Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 269, 2591-2600.
- Tovar-Pérez, E., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A. y Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry* 116, 437-444.
- Urech, K., Jäggy, C. y Schaller, G. (2007). Viscotoxin and mistletoe lectin contents in *Viscum album* L. - Pharmaceutical implications. *Phytomedicine* 14, 16.
- Urnes, P. T. (1969). Nutritional analyses and *in vitro* digestibility of mistletoes browsed by deer in Arizona. *The Journal of Wildlife Management* 33, 499-505.
- Wolfe, K. y Hai, R. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, A-L.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X. y Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry* 111, 370-376.