



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Identificación de Compuestos Bioactivos
de dos Especies del Género *Rubus* del
Estado de Sinaloa y Evaluación del
Potencial Antioxidante y Prooxidante
sobre Gliomas Murinos**

T E S I S

que presenta

Biol Oscar Abel Sánchez Velázquez

para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias con
Orientación en
Biotecnología Agroalimentaria**

Director de Tesis

Dr Edith Oliva Cuevas Rodríguez

Dr Jorge Milán Carrillo

Culiacán Rosales, SIN, MEX

Junio 2016

El presente trabajo de investigación, titulado “Identificación de compuestos bioactivos de dos especies de zarzamoras silvestres (*Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*) del estado de Sinaloa y su efecto oxidante biológico sobre líneas celulares de cáncer”, se realizó en los laboratorios del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología y en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Como asesores académicos participaron: Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez (Directora de Tesis), Dr. Jorge Milán Carrillo (Director de Tesis), Dr. Julio Montes Ávila y Dr. Edgar Rangel López. Este proyecto se realizó de manera interinstitucional participando: Universidad Autónoma de Sinaloa, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez, Instituto Tecnológico de Tijuana, Instituto Nacional de Cancerología, Universidad Nacional Autónoma de México. Este proyecto contó con el financiamiento de PROFAPI/058-2014 (Responsable técnico Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez).

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a **mis padres, Oscar y Aleyda** por todo el apoyo constante e incondicional que me han brindado durante mi vida académica, por estar siempre pendiente de mis logros y tropiezos, por su infinito amor y por ser mi mayor fuente de inspiración para ser una mejor persona día con día.

A **mis hermanos, Anabella y Carlos**, mis mejores aliados en esta vida, les agradezco aguantarme y regañarme, pero sobre todo, espero ser un buen ejemplo para ustedes y que en mi vida sigan siendo parte del motor que me motiva a ser mejor persona y mejor profesional.

A **mis abuelos, Anita, Gaspar, Bella y Abel** por ser los testigos constantes de mi andar en la vida, darme ánimos y tolerar mis ausencias. Cuando sea grande espero no tener niestos tan batallosos como yo.

A **mi familia** le doy las gracias por aportar todo de sí mismos para que esta, y otras metas, se hayan cumplido a cabalidad. También por abrirme las puertas de sus hogares y de sus corazones y que sigan siempre todos mis pasos.

A la **Dra. Edith Cuevas**, le ofrezco todo mi agradecimiento por ser el pilar fundamental de la realización de este proyecto, por las buenas charlas productivas, por escuchar y apoyar mis planes futuros, por sus constantes esfuerzos en convertirme en un mejor profesional, pero principalmente, le agradezco que haya creído en mi.

Al **Dr. Jorge Milán** por su apoyo para echar a andar este proyecto y por compartir su experiencia profesional para echar a andar el trabajo.

Al **Dr. Edgar Rangel** por permitirme trabajar a su lado, brindarme parte de sus conocimientos, por apoyar mi crecimiento académico y por dejarme encontrar a una persona valiosa que pone lo mejor de si para que las cosas salgan adelante.

Al **Dr. Julio Montes**, le agradezco darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría y compartirme sus espacios de trabajo, su tiempo, sus conocimientos y, sobre todo, su buen humor.

A mis compañeros de laboratorio 18, a los que ahora llamo **amigos**. Sólo me queda agradecerles por ser parte vital de este proyecto, que sin su apoyo e interés esto hubiese sido mucho más difícil. De manera especial extendo mi agradecimiento a las tropas mora, moringa, maíz y garbanzo, integradas por **Diana, Lili, Anita, Yudith, Mariela, Diego, Neto, Alfredo, Yuri, Evelyn, Radamés, Carlos, Nallely, Dulce, Gaby y Daniel**.

De igual manera les doy las gracias a mis compañeros del INNN, a los “excitadores” **Ilinova, Hugo, Cinthia, Érika, a las Marys, Anita, Gaby**. También a los patólogos **Nara, Carlos, Jorge, Ricardo, Yéssica, Ivan, Gustavo y Tere**. Así como a los chicos del INCan **Carlitos y Karen**. Sin su apoyo mi estancia no hubiese sido tan grata.

De igual manera agradezco la asesoría botánica que recibí del **Dr. Rito Vega**, la **maestra Cecilia**, el **maestro José Gerardo**, el **maestro Adrián** y la **maestra Gilda**.

Por último, agradezco a todas las personas que directa e indirectamente han aportado un granito de arena para el desarrollo de este proyecto y han contribuido en mi crecimiento personal y profesional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	7
A Biodiversidad de México	7
1 Biodiversidad de Sinaloa	8
B Género <i>Rubus</i>	10
C Frutos de <i>Rubus</i>	14
1 Compuestos bioactivos de frutos de <i>Rubus</i>	17
a Polifenoles	19
i Flavonoides	21
a) Antocianinas	24
ii Taninos	28
a) Taninos hidrolizables o elagitaninos	29
b) Taninos condensados o proantocianidinas	31
b Otros Compuestos y Micronutrientes	33
D Efecto de compuestos bioactivos de <i>Rubus</i> sobre enfermedades crónico-degenerativas (ECD)	35
1 Cáncer	37
a Cánceres del Sistema Nervioso Central (SNC)	39
i Gliomas	39
III JUSTIFICACIÓN	45
IV HIPÓTESIS	46
V OBJETIVOS	47
A Objetivo General	47
B Objetivos Específicos	47
VI MATERIALES Y MÉTODOS	48
A Materiales	49

B Métodos	50
1 Identificación de las especies silvestres de <i>Rubus</i>	50
2 Liofilización de frutos	51
3 Composición química	51
a Proteínas	51
b Lípidos	52
c Cenizas	52
d Humedad	53
e Carbohidratos	53
4 Caracterización de Minerales por Análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA)	53
5 Fraccionamiento de compuestos bioactivos de zarzamora	54
a Extractos crudos (EC)	54
b Separación de la Fracción No Polar (FNP)	54
c Fracción Rica en Polifenoles (FP) y Fracción de Carbohidratos (FCHO)	54
i Fracción Rica en Antocianinas (FRA) y Proantocianidina (FRP)	56
6 Caracterización de las fracciones obtenidas de zarzamoras silvestres	57
a Identificación de antocianinas	57
i Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	57
ii Cromatografía líquida de-ionización por electrospray-espectrometría de masas (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS))	58
b Identificación de proantocianidinas	58
i HPLC	58
ii Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protones (^1H) y carbono (^{13}C)	59
c Análisis por GC-MS de la Fracción No Polar	59

d Derivatización y análisis por GC-MS de la Fracción Rica en Carbohidratos (FCHO)	60
7 Contenido de polifenoles totales del fruto completo, fracciones de polifenoles (FP), antocianinas (FRA) y proantocianidinas (FRP)	60
8 Capacidad antioxidante (ORAC) del fruto, fracciones de polifenoles (FP), antocianinas (FRA) y proantocianidinas (FRP)	61
a ORAC Hidrofílico	61
b ORAC Lipofílico de la Fracción No Polar (FNP)	62
9 Determinación de actividad antioxidante en células HepG2 (AAC)	63
a Cultivo de células HepG2	63
b Ensayos de actividad antioxidante celular (AAC)	63
c Cuantificación de la AAC	64
10 Evaluación del potencial anticancerígeno de extractos de zarzamoras sobre líneas celulares de glioma murinos	65
a Preparación de Medio de Cultivo	65
b Preparación de extractos	65
c Cultivo celular	66
d Aplicación de tratamientos	66
e Tinción con Cristal Violeta	67
f Validación con Rojo Neutro	67
g Tinción con Eosina-Hematoxilina	68
11 Determinación de Daño Oxidativo	68
a Ensayo de Lipoperoxidación	68
b Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	69
c Determinación de Genotoxicidad	69
i Purificación de ADN Genómico	70
ii Electroforesis y revelado de ADN	71
12 Diseño experimental y análisis estadístico	71

VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
	A IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	72
	1 <i>Rubus liebmannii</i>	72
	2 <i>Rubus palmeri</i>	75
	3 <i>Rubus coriifolius</i>	77
	B CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ESPECIES SILVESTRES DE <i>Rubus</i>	80
	1 Composición química de frutos de <i>Rubus</i>	80
	2 Perfil de Minerales	82
	3 Identificación y cuantificación de la fracción no polar (FNP)	84
	4 Identificación y cuantificación de la fracción de carbohidratos (FCHO)	86
	5 Contenido de Polifenoles Totales	89
	6 Identificación y cuantificación de las fracciones ricas en antocianinas (FRA)	92
	7 Identificación y cuantificación de las fracciones ricas en proantocianidinas (FRP)	101
	C CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES DE <i>R.</i> <i>liebmannii</i> y <i>R. Palmeri</i>	111
	D EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE FITOQUÍMICOS DE <i>Rubus</i> SILVESTRES	114
	1 Actividad antioxidante sobre células HepG2	114
	2 Efecto citotóxico de las fracciones sobre células C6 y RG2	118
	3 Determinación de peroxidación lipídica	128
	4 Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	132
	5 Determinación de genotoxicidad	136
VIII	CONCLUSIONES	139
IX	BIBLIOGRAFÍA	142
X	ABREVIATURAS	168

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pag
1	Subgéneros de <i>Rubus</i> y número de especies reportadas en literatura.	11
2	Especies de <i>Rubus</i> con efectos bioactivos sobre la salud humana.	18
3	Antocianinas identificadas en frutos de <i>Rubus</i> .	27
4	Composición química de especies silvestres del género <i>Rubus</i> colectadas en El Palmito, Sinaloa.	81
5	Concentración de minerales presentes en frutos liofilizados (FL) de <i>Rubus liebmannii</i> y <i>Rubus palmeri</i>	83
6	Caracterización de la fracción no polar (FNP) de <i>R. liebmannii</i> y <i>R. Palmeri</i>	85
7	Caracterización y contenido de carbohidratos de <i>R. liebmannii</i> y <i>R. Palmeri</i>	87
8	Contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el fruto y fracciones de <i>R. liebmannii</i> y <i>R. Palmeri</i>	89
9	Porcentaje de antocianinas individuales presentes en frutos liofilizados de ambas especies de <i>Rubus</i>	100
10	Capacidad antioxidante del fruto liofilizado y las fracciones de <i>R. liebmannii</i> y <i>R. palmeri</i> .	112
11	Actividad antioxidante celular (AAC) de fracciones ricas en antocianinas (FRA) de las especies silvestres de <i>Rubus</i>	116
12	Actividad antioxidante celular (AAC) de fracciones ricas en proantocianidinas (FRP) de las especies silvestres de <i>Rubus</i>	117
13	Citotoxicidad sobre células C6 a 24 y 48 h de exposición a las FP, FRA, FRP y FNP de ambas especies.	120
14	Citotoxicidad sobre células RG2 a 24 y 48 h de exposición a las FP, FRA, FRP y FNP de ambas especies.	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Estructura del núcleo flaván, presente en flavonoides	22
2	Estructura química de compuestos derivados de flavonoides	22
3	Estructura química del ion flavilio: un benzopirilio y un anillo fenólico	25
4	Antocianinas indentificadas en especies de <i>Rubus</i>	25
5	Clasificación de taninos	30
6	Estructura de un elagitaninos monoméricos	30
7	Ejemplo de la estructura química de una proantocianidina oligomérica	32
8	Sitio de colecta de especies silvestres de <i>Rubus</i> dentro del terreno ejidal de El Palmito, Concordia, Sinaloa	49
9	Proceso de obtención de fitoquímicos (fraccionamiento) de frutos liofilizados de <i>R. liebmannii</i> y <i>R. Palmeri</i>	55
10	Muestras vegetales empleadas para la identificación de <i>R. Liebmannii</i>	74
11	Distribución geográfica de <i>R. liebmannii</i> en el territorio nacional	74
12	Muestras vegetales empleadas para la identificación de <i>R. palmeri</i>	76
13	Distribución geográfica de <i>R. palmeri</i> en el territorio nacional	76
14	Muestras vegetales empleadas para la identificación de <i>Rubus coriifolius</i>	78
15	Distribución geográfica de <i>R. coriifolius</i> en el territorio nacional	78
16	Cromatogramas de HPLC y LC-ESI-MS de antocianinas de frutos de <i>R. Liebmannii</i> y <i>Rubus palmeri</i>	95
17	Fragmentación de antocianinas presentes en frutos de <i>R. liebmannii</i> de 145-1000 m/z y <i>Rubus liebmannii</i>	96
18	Cromatogramas de HPLC y LC-ESI-MS de antocianinas de frutos de <i>Rubus palmeri</i>	97

19	Fragmentación de antocianinas presentes en frutos de <i>Rubus liebmannii</i> de 160-800 m/z	98
20	Cromatogramas obtenidos por HPLC	103
21	Espectro de masas (MS/MS) de la FRP de <i>Rubus liebmannii</i>	104
22	Espectro de masas (MS/MS) de la FRP de <i>Rubus palmeri</i>	106
23	Espectro de la FRP de <i>Rubus liebmannii</i> por RMN ¹ H	108
24	Espectro de la FRP de <i>Rubus liebmannii</i> por RMN ¹³ C	109
25	Viabilidad de células RG2 tratadas con la fracción rica en antocianinas (FRA) de <i>Rubus liebmannii</i> por 48 h	124
26	Viabilidad de células C6 y RG2 tratadas con la FRP <i>Rubus liebmannii</i> por 24 y 48 h	126
27	Viabilidad de células C6 tratadas con la fracción no polar (FNP) de <i>Rubus palmeri</i> por 48 h	127
28	Formación de MDA por exposición de proantocianidinas sobre células C6 y RG2 a 24 h y 48 h	131
29	Formación de ROS sobre células C6 a 24 h de exposición	134
30	Formación de ROS sobre células RG2 a 24 h de exposición	135
31	ADN teñido con yoduro de propidio en gel de agarosa	138

I RESUMEN

Las zarzamoras (*Rubus spp*) son frutos que se encuentran en casi todo el planeta. Estos frutos son atractivos por sus compuestos bioactivos como polifenoles. En la dieta humana estos compuestos ayudan en funciones quimiopreventivas y curativas ante distintos padecimientos, como el cáncer. Por tanto los compuestos bioactivos de frutos de *Rubus* representan una alternativa terapéutica ante cáncer como los gliomas, cuya sobrevida después del primer año no sobrepasa el 1 % de los casos. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial nutracéutico de compuestos bioactivos de dos especies nativas de zarzamoras del estado de Sinaloa. Los resultados obtenidos indican que la taxonomía de las muestras colectadas en El Palmito, Sinaloa se encuentran 3 especies de zarzamora (*R. liebmannii*, *R. palmeri* y *R. coriifolius*), del análisis de frutos liofilizados de *R. liebmannii* y *R. palmeri* presentan como: K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe, Zn y Cu; ácidos grasos y otros compuestos lipofílicos destacando la presencia de ác. linolénico (28.0%) y ác. oleico (30.7%) y de carbohidratos (fructosa mayoritariamente en ambas especies). La semipurificación de antocianinas y taninos permitieron aislar e identificar compuestos como cianidina-3-glucósido, elagitaninos (lambertianinas y sangüíinas) y proantocianidinas (catequinas y sus derivados e isómeros) en ambas especies, los derivados de casuarictina los encontrados con mayor frecuencia. Por otra lado, la capacidad antioxidante por el método ORAC sugiere que la fracción rica en proantocianidinas (FRP) es alrededor de 20 veces superior a la encontrada en el fruto y 1.3 veces a la de la fracción rica en antocianinas (FRA) en *R. liebmannii*, mientras que en *R. palmeri* la FRP mostró valores 19 veces con respecto al fruto y 1.3 veces por encima de la FRA. En la actividad antioxidante celular (AAC) se encontró que las FRP de ambos frutos valores de 4.68 $\mu\text{mol EQ}/\mu\text{g}$ bs a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *R. liebmannii* y de 3.87 $\mu\text{mol EQ}/\mu\text{g}$ bs 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *R. palmeri*. Las pruebas sobre células C6 y RG2 mostraron el mayor efecto citotóxico en exposiciones de 48 h con la FRP de *R. liebmannii* a una concentración no superior a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De igual manera la FRA de *R. liebmannii* mostró mayor valor en la formación de malondialdehído (MDA), en células RG2 y a 48 h para células C6. Los índices más altos de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se observaron cuando la FRP fue probadas junto con nanopartículas de hierro, a 24 h de exposición las células C6 señalan un mayor formación de ROS a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en RG2 el mayor efecto se observó a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En los ensayos de genotoxicidad se encontró un mayor efecto en células a 24 h de exposición a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los compuestos bioactivos identificados en frutos de zarzamoras silvestres del estado de Sinaloa mostraron tener efecto antioxidante en ensayos *in vitro* y sobre células C6, además, y muestran un comportamiento prooxidante sobre células tumorales de gliomas murinos, lo cual nos sugiere que estos compuestos fitoquímicos presentan potencial terapéutico para este y otro tipo de padecimientos.

Palabras clave: zarzamora, *Rubus*, antioxidante, prooxidante, cáncer, glioma, fenólicos

II INTRODUCCIÓN

Los frutos de especies del género *Rubus*, comúnmente conocidos como moras, zarzas, frambuesas y zarzamoras se distribuyen por todas las tierras emergidas, excluyendo únicamente territorios antárticos y han sido empleados en la etnobotánica y herbolaria tradicional en distintas culturas por milenios para tratar distintos padecimientos tanto infecciosos como no infecciosos (Hummer, 2010). En el mundo existen varios cientos de especies dentro del género *Rubus* (acorde a la fuente que se consulte), de las cuales sólo algunas zarzamoras (*Rubus fruticosus*, *Rubus occidentalis*, *Rubus coreanus*, *Rubus ulmifolius*), frambuesas (*Rubus ideaus*), sus híbridos y variedades son explotadas agrícolamente de manera intensiva, donde sólo en México produjeron para el 2014 cerca de 123 mil toneladas de frutos, lo que representó una derrama económica para el país de más de 659 mdd (SAGARPA, 2015).

Sin embargo, la mayoría de las especies, híbridos y variedades explotadas en el territorio nacional son de origen extranjero, por tanto se tienen que pagar cuantiosas regalías a las empresas e instituciones que poseen las patentes (Weber, 2012). Por otra parte, México cuenta con cerca de 30 especies nativas de *Rubus* las cuales prácticamente no han sido aprovechadas en comparación con las domesticadas, por lo que su uso se confina a pequeños productores o simplemente no tienen un uso que sea fuera de satisfacer necesidades alimenticias de recolectores o como fuente terapéutica en tratamientos herbolarios diversos con bajo sustento científico (Rzedowski y Calderón-Rzedowski, 1981).

Diversas investigaciones sobre frutos de distintas especies de *Rubus* han demostrado que en éstos existe una amplia gama de compuestos con diferentes propiedades bioquímicas, destacando entre ellas las de carácter antioxidante (Ahmad y col., 2015). Dentro de estos compuestos antioxidantes sobresalen los derivados de polifenoles como flavonoides (antocianinas y flavonoles) y taninos (proantocianidinas y elagitaninos) (Lee y col., 2012). La producción, diversidad y cantidad de estos y otros biocompuestos se debe al genotipo y las presiones de agentes endógenos y exógenos sobre las plantas mismas, de tal manera que los materiales cultivados al estar al cuidado de fruticultores y ser ellos quienes cubre muchas sus necesidades básicas como agua, nutrientes y eliminación de plagas, las plantas no explotan el potencial fitoquímico en contraste con plantas de hábitos silvestres (Šarhanová y col., 2012; Martin y col., 2013).

En plantas de *Rubus* que crecen en la naturaleza de manera “autosuficiente” se ha observado que al estar expuestos a una mayor variedad de agentes estresantes como UV, baja calidad nutrimental del suelo, constante ataque de patógenos y herbívoros, competencia por espacio y recursos con otras plantas, estiaje, temperaturas extremas, etc., la producción de compuestos como los polifenoles mencionados son empleados para combatir estados de estrés oxidativo y para proteger directamente biomoléculas y tejidos expuestos a estas condiciones, por lo que se ha encontrado una mayor cantidad de estos compuestos protectores, no sólo en tejidos vegetativos, sino también en tejidos reproductivos como flores, semillas y, especialmente, en frutos (Deighthon y col., 2000; Genebra y col., 2014; Ahmad y col. 2015).

Los derivados fenólicos y compuestos lipofílicos como los tocoferoles, son fitoquímicos que ayudan a los tejidos vegetales a sobrellevar las condiciones poco favorecedoras de desarrollos como las mencionadas anteriormente, pero además de ello, si se les incluye en la dieta favorecen la salud de los consumidores ante diversos padecimientos infecciosos como parasitarios, fúngicos, virales y bacterianos, de igual manera ante enfermedades no infecciosas como crónicas y degenerativas, incluyendo el cáncer (Bushman y col., 2004; Barbosa y col., 2006; Kylli y col., 2011; Giovanelli y col., 2014).

El cáncer es definido por la OMS (2015) como “el proceso y diseminación descontrolada de células que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo”, siendo esta una de las principales causas de muerte en el mundo junta en enfermedades asociadas con problemas cardiacos y diabéticos. Dentro de los tipos de cáncer más comunes se encuentran el cáncer de pulmón, de mama, linfoma y colorectal, cuya sobrevivencia es por encima del 50% en casos de detección temprana (ACS, 2015a). Sin embargo, en cánceres como los de origen en el sistema nervioso central (SNC), < 1% de los pacientes con diagnóstico oportuno tiene la oportunidad de superar la enfermedad (ACS, 2015b).

El cáncer más común, que se origina en el SNC, es el glioma (ACS, 2015b). Este tipo de cáncer se produce en células gliales como astrocitos, oligodendrocitos y microgliales, quienes son las responsables de darle sostén y protección a las mismas neuronas y regulan el estado homeostático en el mismo SNC, principalmente en cerebro (Jensen y Mirsky, 1980). Para tratar este tipo de cáncer se han aplicado distintos tratamientos, iniciando por una remoción quirúrgica

combinada con radioterapia y quimioterapia con fármacos potentes que son poco específicos al momento de atacar del glioma (Memelak y Jacoby, 2007). Por ello se han buscado tratamientos alternativos para tratar padecimientos de esta naturaleza, principalmente los de fuentes naturales que provean compuestos capaces de generar daño celular que detenga o limite la progresión de gliomas (Kim, 2012).

Los compuestos anti radicales libres de frutos de *Rubus silvestris* han mostrado efectos antioxidantes neuroprotectores en tejidos sanos y a la vez, efectos citotóxicos prooxidantes en experimentos *in vitro* sobre líneas celulares de glioma murino y humano y en pruebas *in vivo* sobre gliomas en modelos murinos (Zhao y col., 2010; Kim y col., 2012; Chu y col., 2013; Kula y col., 2015; Lee y col., 2016).

III REVISIÓN DE LITERATURA

A Biodiversidad de México

Se define como biodiversidad o diversidad biológica al conjunto de especies que se encuentran en un sitio geográfico específico (García-Olmedo, 2009) y se compone de la variedad de formas de vida de una región como resultado de miles de millones de años de procesos evolutivos naturales (Fatuyima y col., 2009). La biodiversidad también abarca los diferentes ecosistemas y la diversidad genética dentro de las especies, así como las interacciones existentes entre estos (UNEP, 2010). En el planeta se han descrito aproximadamente 2 millones de especies (Chapman, 2009), sin embargo, se algunas estimaciones mencionan la existencia de entre 11 y 12 millones (Pullin, 2002) hasta 30 millones de especies totales en el planeta (Erwin, 1982).

México, al ubicarse entre los 32° y 14° norte y 86° y 118° oeste, es la zona de convergencia de las dos zonas biogeográficas del occidente del globo: el Neártico y el Neotrópico. Estas características, aunadas a la orografía de los casi 2 millones de km² del territorio continental y más de 3 millones de km² de zona marítima exclusiva, crean una gran variedad de climas y ecosistemas dentro de los cuales se ha calculado que coexisten entre el 10 y 12% de todas las especies biológicas catalogadas por la ciencia (SERMARNAT, 2015).

La diversidad biológica representa para los humanos uno de los patrimonios más preciados con los que cuenta, ya que esta representa su principal fuente alimenticia, de materias primas, de servicios ambientales, económica y farmacológica (Mendelshon y Balick, 1997; Wilson, 2002). Este último aspecto es

de suma relevancia, puesto que el mundo biológico es el mayor reservorio de compuestos medicinales, principalmente de origen bacteriológico, micótico y, sobre todo, vegetal (Mendelshon y Balick, 1995; GMO, 2006).

1 **Biodiversidad de Sinaloa**

El estado de Sinaloa se ubica en la parte central del NO mexicano, entre los 22° 31' y los 26° 56' N y los 105° 24' y los 109° 27' O, limitando al N con el estado de Sonora, al NE con Chihuahua, al E con Durango, al SE con Nayarit y al S, O y NO con el Golfo de California y tiene una superficie territorial de 58,092 km². Geomorfológicamente, Sinaloa es el producto de desprendimientos del eje montañoso de la Sierra Madre Occidental, a consecuencia de acciones tectónicas del periodo Terciario. Las condiciones climáticas del territorio son variables acorde a la altitud y geoposición, ya que en las llanuras costeras (< 200 msnm) el clima es cálido subhúmedo (Aw) en el centro y sur del estado, mientras que en el noroeste decrecen las precipitaciones, lo que genera un clima más seco y árido (BW). De manera contrastante, en las regiones relativamente altas del estado (>1000 msnm) las condiciones climáticas favorecen mayores precipitaciones y un clima más fresco (Cifuentes-Lemus y Gaxiola-López, 2003). Dichos aspectos geográficos propician en el estado la existencia de diversos ecosistemas tanto marinos como terrestre, encontrándose entre los principales los manglares, marismas, bosques espinosos, bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, bosques de pino-encino y bosques mesófilos de montaña, acarreado con ellos una amplia gama de diversidad biológica, influenciado tanto por especies del Neoártico como del Neotrópico (Cifuentes-Lemus y Gaxiola-López, 2006).

Dentro de los grupos biológicos más representativos del Sinaloa se encuentra el de la flora vascular con cerca de 7,500 especies estimadas (Vega-Aviña y col., 1989), donde se agrupan plantas con tejidos conductivos compuesto por el xilema y el floema, las cuales producen semillas y hojas y tienen cuerpos lignificados o herbáceos. Se cree que estas plantas evolucionaron a partir de algas de hábitos terrestres que tenían la capacidad de producir metabolitos secundarios para prosperar en las condiciones adversas del medio terrestre (Mauseth, 2003).

Esta riqueza de especies vegetales presente en Sinaloa se compone principalmente de las familias asteraceae (girasol, manzanilla, cártamo), fabaceae (frijol, tabachín, guamúchil), poaceae (carrizos, pastos, maíz,), solanaceae (tomate, chile), cucurbitaceae (pepino, calabaza) y cactaceae (cardón, nopal, tuna), todas estas con algunos especímenes de interés económico (Vega-Aviña, 2000; Cifuentes-Lemus y Gaxiola-López, 2002). Este aspecto ha influenciado directamente el desarrollo de actividades agroalimentarias en el Sinaloa actual, dejando por un lado el aprovechamiento de muchas de las especies nativas poco explotadas o reemplazándolas por variedades o especies introducidas que son de origen extranjero. Tal es el caso de las zarzamoras nativas (*Rubus*), no sólo sinaloenses, sino de todo el territorio nacional, cuya producción ha sido desplazada por el cultivo de especies, variedades e híbridos no nativos, dejando por un lado un componente importante de la agrobiodiversidad con potencial agroalimentario propio de México (Parra-Quezada y col, 2007; Perales-Rivera y Aguirre-Rivera, 2009; Cárdenas-Castillo, 2013; Bàrberi, 2013).

B GÉNERO *Rubus*

Rubus es un género que abarca algunas de las llamadas berries, frutas del bosque o frutillas, que incluyen las moras, zarzas, frambuesas y zarzamoras, las cuales son dicotiledóneas perteneciente al orden de los Rosales, siendo *Rubus* uno de los aproximadamente 130 géneros estimados dentro de la familia Rosaceae (Grijalva y col., 2007), que a su vez comprende rosales, manzanos, perales, fresas, ciruelos y demás plantas de interés socioeconómico (Cancino-Escalante y col, 2012). Existen distintas estimaciones sobre la cantidad de especies que componen este género, puesto que Rzedowski y Calderón de Rzedowski (1981) estiman aproximadamente 250 especies, mientras que algunos otros autores mencionan que hay en el mundo entre 700 y 750 especies (Alice y Campbell, 1999; Tomczyk y Gudj, 2005) agrupadas en 12 subgéneros, aunque recientes clasificaciones basadas en el mismo sistema mencionan una cantidad específica de sólo 429 especies dentro de los mismos 12 subgéneros (Mertz y col., 2007) (**Cuadro 1**). Pese a este escenario, uno de los trabajos más exhaustivo para determinar la cantidad de especies dentro del género *Rubus* es el que realiza el Jardín Botánico de Nueva York, donde del total de 2,208 especímenes descritos a través de los años, se han aceptado sólo 331 como especies verdaderas (TPL, 2014), tomando como especie tipo a *Rubus fruticosus* L.

Las plantas de *Rubus* son arbustos perennes de hábitos rastreros y/o trepadores, con espinas coriáceas curvadas; los tallos son arqueados o

Cuadro 1. Subgéneros de *Rubus* y número de especies reportadas en literatura.

Subgéneros	Número de Especies	Código	Costo Monofilético*
<i>Anoplobatus</i> (Focke) Focke	6	<i>An</i>	15
<i>Chamaebatus</i> (Focke) Focke	5	<i>Cb</i>	6
<i>Chamaemorus</i> (Hill) Focke	1	<i>Cm</i>	^ND
<i>Comaropsis</i> (Rich.) Focke	2	<i>Co</i>	^ND
<i>Cylactis</i> (Raf.) Focke	14 (4 series)	<i>Cy</i>	28
<i>Dalibarda</i> (L.) Focke	5	<i>Da</i>	25
<i>Dalibardastrum</i> Focke	4	<i>Ds</i>	3
<i>Idaeobatus</i> (Focke) Focke	117 (9 secciones)	<i>Id</i>	31
<i>Lampobatus</i> Focke	10	<i>La</i>	23
<i>Malachobatus</i> (Focke) Focke	115 (7 secciones)	<i>Ma</i>	2
<i>Orobatus</i> Focke	19	<i>Or</i>	0
<i>Rubus</i> L. (5 <i>Eubatus</i> Focke)	132 (6 secciones)	<i>Ru</i>	4

Alice y Campbell, 1999.

*Representa el número de estudios requeridos para llegar a tal cifra concluyente.

^ND: No Disponible.

erectos, cubiertos de pilosidades (en ocasiones glandulares) o glabros, herbáceos o lignificados; hojas compuestas, alternas, pilosas o glabras, de margen dentado, generalmente lanceoladas; inflorescencias terminales pilosas, glandulares o glabras; flores actinomórficas (simetría radial), pentaméricas, perfectas, con pétalos de blanco a morado; frutos en polidrupas persistentes o caedizas, con coloración del amarillo al morado oscuro (Linneo, 1753).

La distribución geográfica del género abarca especialmente las zonas templadas del hemisferio norte, pero se les puede encontrar por todo el mundo (con excepción de la Antártida), incluidas islas oceánicas, cordilleras tropicales y hasta en el círculo polar ártico (Alice y Campbell, 1999), estando de manera silvestre o domesticada, con un número aún mayor de subespecies, variedades e híbridos producidos natural y antropogénicamente (Hummer, 2010). Las plantas dentro del género son de hábitos vegetativos diversos, ya que se les puede encontrar en forma arbustiva, rastrera y/o trepadora, en ocasiones se agregan varias plantas y forman corredores extensos de comunidades de *Rubus* de una o más especies dentro de cierto terreno (Rzedowski y Calderón-Rzedowski, 2005). De esta manera se les puede encontrar tanto en forma individual, dispersa o en agrupaciones, pudiendo darse algunos híbridos entre *Rubus* vecinas (Alice, 1999). Ecológicamente, cumplen un papel vital en la colonización de nuevos terrenos (vegetación secundaria), adaptándose a distintos tipos de suelos e iluminación, creando condiciones atractivas para la invasión de otros grupos botánicos más exigentes (vegetación primaria), ya que atraen a dispersores de semillas como aves, mamíferos e insectos, creando refugios entre sus tallos y hojas espinosas, proporcionan sitios de

caza y demás (Weber, 1992; Amsellen y col., 2000; Caplan y col., 2010; Gorchov y col., 2011; Ernoult y col., 2013; Gutiérrez-Guzmán, 2014).

La variabilidad genética del género *Rubus* producida por los distintos factores evolutivos ha dado como resultado que las especies generen sus propios compuestos fitoquímicos para tolerar las condiciones climáticas específicas a sus sitios de distribución (Baret, 2003; Morden, 2003; Robbins, 2003). Muchas especies de *Rubus* crecen en sitios tropicales o subtropicales y sufren los drásticos cambios meteorológicos impuestos por el clima durante las transiciones estacionales o inclusive en un mismo día, como la oscilación en la humedad relativa, lluvias torrenciales, estiaje, temperaturas extremas, además de factores bióticos como el ataque de fitófagos y patógenos (Šarhanová y col., 2012; Martin y col., 2013).

En términos etnobotánicos, se trata de un género valorado en los cinco continentes por sus propiedades pigmentantes, medicinales, alimenticias y nutricionales en general (Brown, 1980; Navarro y Avendaño, 2002; Mertz y col., 2007; Barbosa y col., 2007; Acosta-Montoya y col., 2010). El uso de *Rubus* en la medicina y gastronomía nativas ha sido reportado por escritos de culturas como la griega, india, romana, china y egipcia (Hummer, 2010). En los últimos años se le ha prestado especial atención a las propiedades antioxidantes de los frutos maduros e inmaduros de distintas especies de *Rubus* domesticadas y silvestres (Acosta-Montoya y col., 2010), debido a que se ha encontrado una gran fuente de sustancias antioxidantes derivadas de los compuestos fenólicos y otras fuentes como las vitaminas (Acosta-Montoya y col., 2009; Martínez-Cruz y col., 2011; Bernal y col., 2014).

En México se han reportado cerca de 28 especies de *Rubus* (Rzedowski y Calderón-Rzedowski, 1981), distribuyéndose en zonas boscosas por encima de los 1000 msnm de todo el país (CONABIO, 2010), donde subsisten en sitios poco favorables para otras especies, donde toleran suelos ácidos, la constante exposición a rayos UV (Harborne y Williams, 2000), el ataque de patógenos y herbívoros, entre otros factores nocivos (Stoffel-Efron y col., 2012; Brito y col., 2014). Estas condiciones ambientales inducen el aumento en la producción de radicales libres en las plantas, incrementando así el estrés oxidativo (Atkinson y col., 2005). Por tanto, las plantas producen sustancias antioxidantes para soportar dichas circunstancias dañinas para sus partes anatómicas como hojas, tallos, raíces, flores y, especialmente, en frutos (Siriwoharn, 2004; Acosta-Montoya y col., 2009).

C Frutos de *Rubus*

Los frutos de *Rubus* son polidrupas pequeñas con un número muy variable de frutillas agregadas conformando las llamadas drupelas o mini drupas (Chávez-Bárceñas y col., 2012), cada una con una semilla diminuta alargada de escasos 2 mm de longitud y 1 mm de ancho, de color café claro, con testa rugosa y sumamente resistente (Andrade, 2006; Parra, 2007). La dermis y pulpa son de color variable dependiendo de la especie, puesto que algunas al madurar dan tonalidades amarillas, sin embargo la mayoría van del rojo al negro, pero varían del verde hasta un morado rojizo durante el proceso de maduración y dependiendo de la especie (Hummer, 1996; Bolmgren y Erickson, 1998; Andrade, 2006), dentro de los cuales

sobresalen las llamadas zarzas, las frambuesas, las moras y las zarzamoras (Monasterio-Huelin, 1992; Hummer, 2010; Lee y col., 2012).

El fruto posee un elevado porcentaje de agua, el cual suma cerca del 80% del peso, siendo el resto azúcares, vitaminas, sales de calcio y ácidos orgánicos, entre otros componentes variables acorde la especie (Andrade, 2006). Sin embargo, para la maduración de estos se ve involucrada una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que generan aumento en el volumen y peso del fruto, cambios en la tasa respiratoria, en el contenido de agua, transiciones de pigmentación, texturas, producción de sabores y aromas (Manning, 1998; Chávez-Bárcenas y col., 2012).

Las condiciones ambientales (bióticas y abióticas) son quienes afectan en mayor proporción la sobreexpresión y biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas de zarzamora, incluyendo sus frutos. Esto afecta la calidad de estos en distintos aspectos, incluyendo su pigmentación, sabor, olor, estado de maduración y el contenido compuestos naturales (Stoffel-Efrom y col., 2012). La concentración de estos compuestos se encuentran en mayor proporción en las partes más vulnerables a sufrir daños ambientales como la epidermis y la pulpa del fruto (Prior, 2003; Puupponen-Pimiä, 2005). Estímulos externos e internos, como la temperatura, luz, disponibilidad de agua, nutrientes y el efecto de los reguladores génicos y fitohormonas, son los responsables de la expresión de genes controladores de la biosíntesis de compuestos protectores en los frutos (Manning, 1998; Chen y col., 2012), siendo especialmente los llamados “genes reguladores de la expresión de etileno”, los que controlan el proceso de formación de compuestos

con alta actividad biológica y de maduración, lo que hace de este fruto del tipo no climatérico (Cheng y Breen, 1991).

Las zarzamoras son frutos con escaso aporte de carbohidratos, es por ello que se les conoce como frutos de bajo valor calórico, en comparación con otros frutos de rosáceas como manzanas, peras, ciruelas y cerezas (USDA, 2014), sin embargo, tienen cantidades importantes de compuestos fenólicos, minerales y ácidos grasos esenciales en contraste a otros frutos (Bushman y col., 2004); son una excelente fuente de vitaminas, en especial de vitamina A, C y E (Charley, 1989). Estas tres vitaminas convierten a este fruto en un buen alimento antioxidante, además de la abundancia de polifenoles presentes en ellos (Green, 1971). Debido a esto, se ha visto un incremento en la cantidad de estudios relacionados con la presencia de compuestos de importancia nutracéutica en frutillas del género *Rubus* (FAO, 2002; Shipp y Abdel-Aal, 2010), así como de *Ribes*, *Vaccidium* y *Fragaria* (grosella, arándano y fresa, respectivamente), además de bayas de *Sambucus* y *Bauhinia* (Agrawal y col., 2009; Fazio y col., 2013).

Como se mencionó, alimentos de origen vegetal como estos frutos son ricos en pigmentos derivados del metabolismo secundario, que le dan atractivos visuales dirigidos a los comensales (Feria-Arroyo y col., 2013). Para que dichos colores sean intensos las plantas realizan una serie de desgastantes reacciones en cadena para producir xantones, isocromones, curcuminoides, carotenoides y, sobre todo, polifenoles que se destacan por ser compuestos con importante actividad biológica (IFIC y FUSDA, 2004; Velišek, 2008).

1 Compuestos Bioactivos de Frutos de *Rubus*

Los compuestos bioactivos en el campo de la alimentación y, específicamente, en lo que concierne a alimentos funcionales, se definen como aquellos compuestos químicos que ejercen un efecto positivo en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos que son benéficos para la salud, produciendo una mejora y/o la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad, exhibiendo una amplia gama de actividades farmacológicas (Milner, 2004; Drago, 2006; Barrón-Yáñez, 2011). Estos se encuentran generalmente en plantas en pequeñas cantidades y disponibles para su consumo en muchos alimentos de origen vegetal. Por tanto, son fitoquímicos con actividad biológica dentro del organismo y que ayudan a promover un buen estado de salud (Drago-Serrano y col., 2006). Estos compuestos presentes en muchos alimentos de origen vegetal como los frutos de *Rubus* son el objeto de estudio de muchos trabajos de investigación científica, especialmente por ser una gran herramienta en la prevención de varios tipos de cáncer (Wang y col., 2008), padecimientos cardiacos, diabetes, infecciones parasitarias y microbianas (Aguilar-Contreras y col., 1994; Romero, 2008; Jiménez-Arellanos y col., 2012), procesos inflamatorios, entre otros estados patológicos transmisibles y no transmisibles (Roberfroid, 1999; Harborne y Williams, 2000; Katsube y col., 2003; Dai y col., 2009; Li y col., 2009; Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014; Ríaz y col., 2014) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2: Especies de *Rubus* con efectos bioactivos sobre la salud humana.

Especie	Efecto	Principio Activo	Referencias
<i>R. adenotrichus</i>	Antiinflamatorio	Antocianinas, Proantocianidinas	Azofeifa y col., 2013.
<i>R. alceifolius</i>	Antidiabético	Polifenoles	Mootoosamy y Mahomoodally, 2014.
<i>R. chamaemorus</i>	Antidiabético Contra obesidad	Antocianinas, Proantocianidinas	Kellog y col., 2010.
<i>R. coreanus</i>	Anticancerígeno, Neuroprotector, Antiinflamario	Polifenoles	Kim y col., 2012; Kim y col., 2013.
<i>R. coriifolius</i>	Antiparasitaria	Proantocianidinas	Barbosa y col., 2007.
<i>R. ellipticus</i>	Antitumoral	Polifenoles	Plackal-George y col., 2013.
<i>R. fairholmianus</i>	Antiinflamatorio Anticancerígeno	Polifenoles	George y col., 2014; Adimuriyil-George y col., 2015.
<i>R. fruticosus</i>	Antidiabético, Antiinflamatorio, Neurofarmacológico, Anticancerígeno, Antiviral, Antidiarreico, Antimicrobiana	Antocianinas, Proantocianidinas, Elagitaninos, Tocoferoles, Minerales, Esteroles	Bagchi, 2004; Wang y col., 2008; Dai y col., 2009; Srivastava y col., 2010; Fan y col., 2013; Johnson y col., 2013; Sangiovanni y col., 2013; Ríaz y col., 2014 Zia-Ul-Haq y col., 2014
<i>R. glaucus</i>	Antimicrobiana	Antocianinas	Ramírez-González y col., 2007.
<i>R. idaeus</i>	Anticancerígeno	Proantocianidinas	Lee y col., 2016
<i>R. liebmannii</i>	Antiparasitario	Catequina, Epicatequina, β -Sitosterol	Jiménez–Arellanes y col., 2012.
<i>R. parvifolius</i>	Antibacterial	Extracto lipídico	Cai y col., 2012.
<i>R. spectabilis</i>	Antidiabético, Contra obesidad	Antocianinas, Proantocianidinas	Kellog y col., 2010.
<i>R. ulmifolius</i>	Antibacterial, Antiinflamatorio, Antifúngico	Taninos hidrolizables, Ácidos fenólicos	Sisti y col., 2008; Brandi y col., 2007; Quave y col., 2012; Manca y col., 2015

Por tanto, son una fuente farmacológica contra enfermedades de manera preventiva y curativa (Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014; Zia-Ul-Haq y col., 2014).

Dentro de las controversiales agrupaciones de los compuestos bioactivos aparece la clasificación por su naturaleza química, donde se discrimina a los compuestos acorde a su estructura molecular que incluye varias categorías de subclasificación, destacando entre ellos los carbohidratos y sus derivados, ácidos grasos, derivados de isoprenoides, sustancias a base de aminoácidos, minerales y polifenoles y sus derivados (Jones, 2002), siendo estos últimos de gran importancia por su naturaleza antioxidante (Sharma, 2014). Estas moléculas se caracterizan por ser sustancias capaces de retardar o evitar la oxidación de otras moléculas o agentes oxidantes, lo cual se traduce a un posible daño celular (Wang y Jiao, 2000; Wang y Lin, 2000:) y han servido como herramienta de estudio para hacer tratamientos clínicos experimentales sobre algunos desórdenes degenerativos sobre la salud humana (Bhandary, 2012), siendo los frutos de *Rubus*, especialmente ricos en cuanto a variedad y cantidad de estos compuestos (Wang y col., 1996).

a Polifenoles

Los polifenoles son un grupo heterogéneo de cerca de 8,000 compuestos químicos generados por las plantas como metabolitos secundarios necesarios para diversos procesos fisiológicos de defensa, fotosintéticos, de resistencia, de tolerancia y adaptativos a una gran variedad de condiciones ambientales que tienen que enfrentar constantemente, esto quiere decir que no participan directamente sobre su desarrollo y crecimiento (Ramírez y col., 2009), pero su presencia es necesaria para que se den estos procesos (Hollman y col, 1997; Mattila, 2002;

Valencia-Sullca y Guevara-Pérez, 2013). En términos generales, los polifenoles se encuentran presentes en una gran variedad de alimentos de consumo cotidiano como en verduras, vino tinto y frutos rojos. Estos productos tienen una gran actividad antioxidante, debido a la variedad y concentración de polifenoles que contienen, por lo cual se ha encontrado que una dieta rica en estos es útil para prevenir fallas cardíacas, aterosclerosis y neoplasias, además de tener actividad antiinflamatoria, antiviral y antimicrobiana (Nijveltd, 2001, Liu y col., 2003; Sharma, 2014). Dentro de los polifenoles encontrados con mayor frecuencia abundancia en frutos de *Rubus* están los estilbenos, ácidos fenólicos, taninos y flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavanoles, flavanones e isoflavonoides) (Manach y col., 2005; Han y col., 2007; Seeram, 2008; Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014), variando en concentración y en la capacidad de capturar y neutralizar radicales libre como O₂, OH, NO, alquilos y peroxilos (Ramírez y col., 2009). Los polifenoles han sido clasificados por varios sistemas, sin embargo, Milenkovic y col., 2013 y Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014 agrupan los polifenoles de berries en cinco categorías acorde a su estructura química en: 1) ácidos fenólicos como el ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzóicos; 2) estilbenos (resveratrol, pterostilbeno); 3) lignanos; 3) taninos como proantocianidinas y elagitaninos; y 5) flavonoides como flavonoles, flavalones y antocianinas, siendo los flavonoides y los taninos a los que se les ha prestado mayor atención por su biodisponibilidad y el papel que juegan para mantener un buen estado de salud en las personas con dietas ricas frutos de *Rubus*

i Flavonoides

Los flavonoides son compuestos bioactivos extensamente distribuidos en alimentos de origen vegetal, siendo uno de los grupos de metabolitos vegetales con mayor diversidad de compuestos, ya que aproximadamente 10,000 de ellos han sido identificados hasta el momento (Harborne y Williams, 2000; Heim y col., 2002; Pérez-Trueba, 2003; Velišek y col., 2008; Carvalho y col., 2013). En las plantas juegan un papel vital en la protección contra agentes bióticos y abióticos dañinos, tienen propiedades antioxidantes, antibacterianas y antivirales y también tienen un importante rol en la regulación y expresión de genes (Pollastri y Tattini, 2011; Hyun y col., 2014; Xiao y col., 2014; Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014; Yoshida y col., 2015).

Los flavonoides han sido clasificados acorde a su estructura química, la cual se caracteriza por tener una estructura de tres anillos formados por dos centros aromáticos y un heterociclo central oxigenado, con un núcleo flaván (**Figura 1**) y que consta de 15 átomos de carbono (IUPAC, 2006). Entre los principales flavonoides de *Rubus* destacan los flavanones, flavonas, flavanoles, flavan-3-oles, antocianinas e isoflavonas (Majewska y Czczot, 2009) (**Figura 2**).

Evolutivamente hablando, los flavonoides aparecieron por primera vez en las embriofitas (ancestros de todos los musgos, helechos, gimnospermas y angiospermas actuales), los cuales le confirieron a este grupo una gran capacidad de adaptación a los factores climáticos terrestres que variaban más que los de medios acuáticos (Martínez-Flórez y col., 2002). Se presenta una vía biosintética

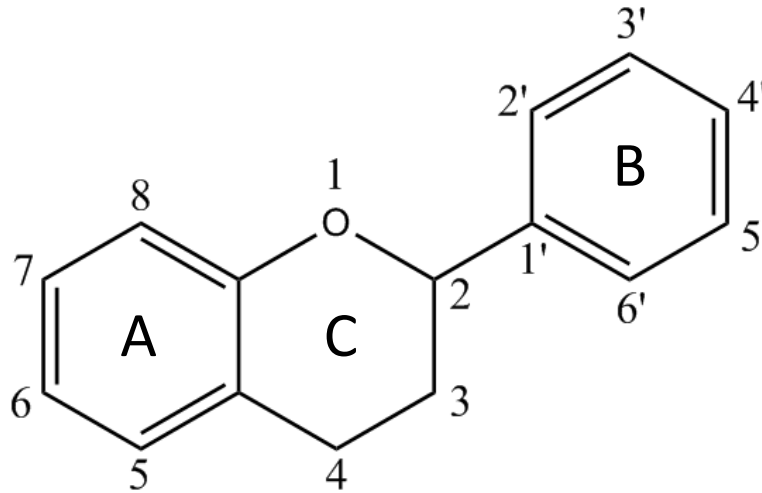


Figura 1. Estructura del núcleo flaván, presente en todos los subtipos de flavonoides (Fan, 2013).

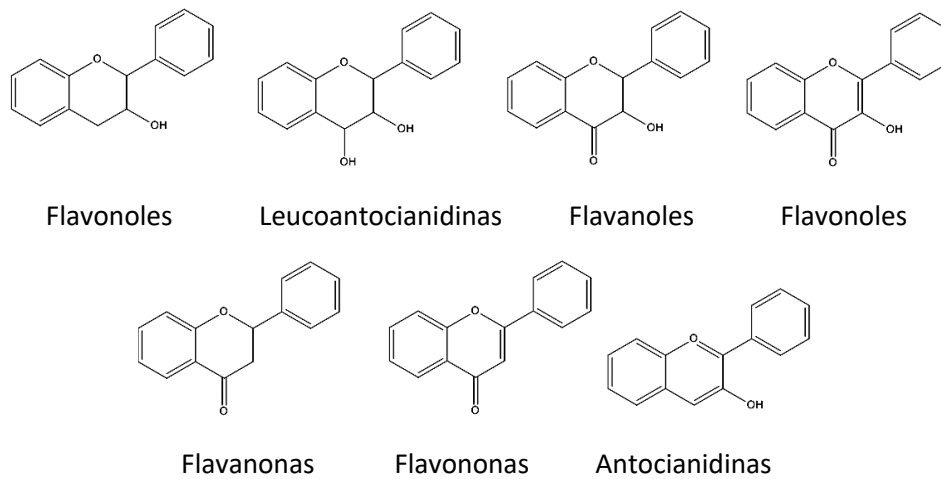


Figura 2. Estructura química de compuestos derivados de flavonoides (Fan y col., 2013).

muy conservada en todos los grupos vegetales actuales pero que con el tiempo ha divergido en una gran variedad de compuestos para funciones diversas para adaptarse a las condiciones complejas de los diferentes ecosistemas y de los depredadores (Morden y col, 2003). Los herbívoros aprendieron a metabolizar muchos de los flavonoides producidos por las plantas y ahora son empleados a favor en varios procesos fisiológicos, ya que estos protegen a los humanos y el resto de los animales del daño oxidativo, contaminación ambiental, químicos tóxicos, rayos UV, etc. Como el organismo no puede sintetizar estos fitoquímicos es necesario que los incorpore a su sistema mediante la constante ingesta de alimentos de origen vegetal (Shirley y col., 1996).

La variabilidad de los grupos sustituyentes en estos tres anillos es lo que genera su diversidad y acción bioquímica (Malolepzsza y Urbanek, 2000). Debido a su estructura química los flavonoides son capaces de actuar como agentes antioxidantes, donar hidrógenos o electrones a los radicales libres, así como capturarlos y desplazarlos en su estructura aromática (Heim y col., 2002). Dentro de los flavonoides mayor estudiados se encuentran las flavonoles y los flavones, sin embargo, actualmente el estudio antocianinas y flavan-3-ols (combinados en proantocianidinas) han sido los de mayor interés por distintas razones, puesto que son químicamente variables, abundantes y disponibles en la naturaleza, tienen un alto potencial nutracéutico y son benéficos sobre la salud humana (Peterson y col., 2012; Yoshida y col., 2015).

a) Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de fitoquímicos dentro de los flavonoides capaces de observarse en el rango de los 500nm de la luz visible, dando de esta manera tinciones de púrpura, violeta, rojo, naranja y azul presentes en frutos, flores, hojas, tallos y frutos (Markakis y col., 1974; Harborne y Williams, 2000; Peña-Varelay col; 2006); dichos colores son proporcionados en gran medida por el pH, el grado de hidroxilación en sus anillos, metilación, glucosidación o asilación, unión a metales como hierro y aluminio (Heim y col., 2002). Estas se sintetizan a través de varias vías como la de los fenilpropanoides por el metabolismo de fenilalanina (Famiani y Walker, 2009; Velíšek y col., 2008; Koca y Karaman, 2015), son producidos por gimnospermas y angiospermas (excepto el orden Caryophyllales, quienes producen betalaínas en lugar de antocianinas) (Delgado-Vargas y col., 2000; Mosco, 2012). Existen varios genes involucrados en su síntesis, su activación se debe a la estimulación de varios factores y son tejido específicos, siendo los de células dérmicas donde existe una sobreexpresión (Lepiniec y col., 2006).

Químicamente hablando, las antocianinas están constituidas por moléculas de antocianidina o aglicona (cuya estructura básica es el ion flavilio (**Figura 3**)) consiste en un anillo aromático [A] unido a un anillo heterocíclico [C] que contiene oxígeno que está también unido a un enlace de carbono-carbono a un tercer anillo aromático [B] (**Figura 4**). Cuando las antocianidinas se encuentran en forma glucosilada o acilada la estructura se conoce como antocianina (Timberlake y

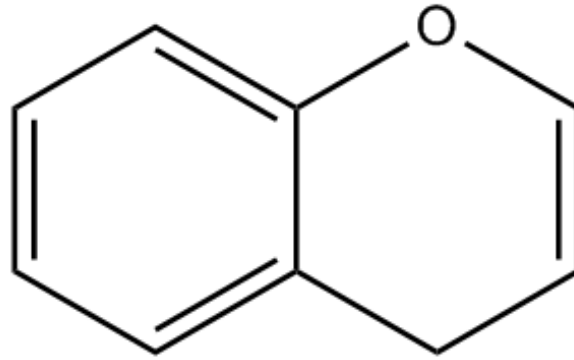


Figura 3. Estructura química del ion flavilio: un benzopirilio y un anillo fenólico (Timberlake y Bridle, 1967).

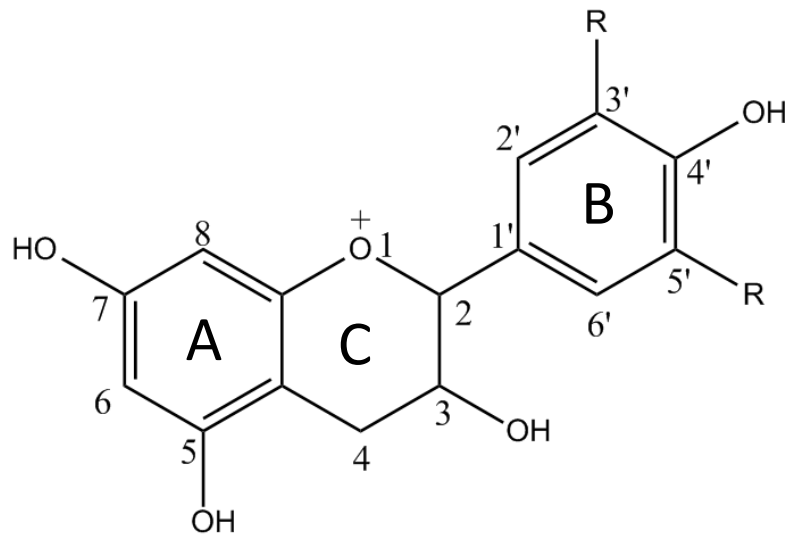


Figura 4. Representación más común antocianinas presentes en *Rubus* (Delgado-Vargas y col., 2000; Bunea, 2013).

Bridle, 1967; Dugo y col., 2001; Villanueva-Tiburcio y col., 2010; Quintero-Cerón y col., 2014).

Ecológicamente cumplen un papel importante al dar fragancias y colores a las flores para atraer a los polinizadores, ya que los fotorreceptores de insectos y aves se ven atraídos por las distintas tonalidades de los sépalos, pétalos y órganos sexuales, pudiendo discriminar entre flores con mayor concentración y riqueza de nutrientes. En frutos afectan el sabor y color para atraer zoócoros, ya que estas se acumulan en la parte interior de la membrana dérmica de las drupelas (Weirmann, 1981).

Las antocianinas presentes en los llamados frutos rojos o del bosque son el tipo de compuesto polifenólicos más estudiado por el ámbito científico, esencialmente, por los beneficios que tienen en la salud humana, ya que numerosos estudios muestran resultados sumamente prometedores en el tratamiento de enfermedades crónicas, degenerativas y transmisibles. Todo lo anterior debido a la acción de las propiedades químicas preventivas y quimioterapéuticas (Feng, y col., 2004; Ding y col., 2006; Bowen-Forbes y col., 2010). En frutos de *Rubus* se han identificado más de 50 antocianinas diferentes, dentro de las cuales destacan la cianidina-3-glucósido, la cianidina-3-rutinósido y la pelargonidina-3-glucósido como las más comunes y abundantes (**Cuadro 3**).

Estos efectos beneficiosos se han visto inclusive en estudios oncológicos a distintos niveles y sobre diversos tipos de células tumorales. Por su parte, Diaconeasa y col. (2015) evaluaron el potencial antiproliferativo y antioxidante de fracciones de antocianinas de arándano y grosella sobre tres tipos de células

Cuadro 3. Antocianinas identificadas en frutos de *Rubus*.

Especie	Muestra	Antocianinas	Referencias
<i>R. acuminatus</i>	Fruto fresco	3,4	Bowen-Forbes y col., 2010.
<i>R. adenotrichus</i>	Fruto fresco, fruto seco	3,13	Mertz y col., 2007; Acosta-Montoya y col., 2010; Azofeifa y col., 2013; Martínez-Cruz y col., 2011.
<i>R. articus</i>	Fruto seco	3,4,20,21	Matta-Riihinen y col., 2004.
<i>R. chamaemorus</i>	Fruto seco	3,4,6,12	Matta-Riihinen y col., 2004; Koponen y col., 2007.
<i>R. coreanus</i>	Fruto fresco	3-5,14,21	Bae y col., 2007; Ku y Mun, 2008; Kim y col., 2011.
<i>R. fruticosus</i>	Vino, Fruto fresco	1-3,10,15,16,18,19,24,26,27	Johnson y col., 2013.
<i>R. fruticosus</i>	Fruto fresco	3	Jakobek y col., 2009.
<i>R. fruticosus</i>	Fruto seco	1,3,4,7,11,13,17	Dai y col., 2007; Cuevas-Rodríguez y col., 2010.
<i>R. glaucus</i>	Fruto fresco	3-5,15,20,21	Mertz y col., 2007; Garzon y col., 2009; Vasco y col., 2009; Estupinan y col., 2011.
<i>R. idaeus</i>	Fruto fresco	3,4,6,8,9,12,20-23	Mullen y col., 2002; Matta-Riihinen y col., 2004; Kazim y col., 2009; Jakobek y col., 2009; Salinas-Moreno y col., 2009; Remberg y col., 2010.
<i>R. jamaicensis</i>	Fruto fresco	3,13	Bowen-Forbes y col., 2010.
<i>R. moluccanus</i>	Fruto fresco	3,4,21	Netzel y col., 2010.
<i>R. occidentalis</i>	Fruto fresco	3-5,14,21,25	Harborne y Hall, 1964; Hong y Wrolstad y col., 1990; Stoner y col., 2005; Dosset y col., 2008, 2010,2011; Ling y col., 2009; Wyzgoski y col., 2010.
<i>R. odoratus</i>	Fruto fresco	3,4,20,21	Harborne y Hall, 1964.
<i>R. parviflorus</i>	Fruto fresco	3,4,20	Harborne y Hall, 1964; Matta-Riihinen y col., 2004.
<i>R. pinnatus</i>	Fruto seco	3,4	Byamukama y col., 2005.
<i>R. racemosus</i>	Fruto fresco	3,4	Bowen-Forbes y col., 2010.
<i>R. rigidus</i>	Fruto fresco	3,4	Byamukama y col., 2005.
<i>R. rosiflorus</i>	Fruto fresco	3,20,21	Bowen-Forbes y col., 2010.

1. Cianidina-3-arabinósido; 2. Cianidina-3-galactósido; 3. Cianidina-3-glucósido; 4. Cianidina-3-rutinósido; 5. Cianidina-3-sambubiósido; 6. Cianidina-3-soforósido; 7. Cianidina-3-xilósido; 8. Cianidina-3,5-diglucósido; 9. Cianidina-3-soforósido-5-ramnósido; 10. Cianidina-6-acetil-3-glucósido; 11. Cianidina-3-dioxalilglucósido; 12. Cianidina-3-glucosilrutinósido; 13. Cianidina-3-(malonil)-glucósido; 14. Cianidina-3-xilosilrutinósido; 15. Delfinidina-3-arabinósido; 16. Delfinidina-3-glucósido; 17. Delfinidina-3-xilósido; 18. Malvidina-3-arabinósido; 19. Malvidina-3-glucósido; 20. Pelargonidina-3-glucósido; 21. Pelargonidina-3-rutinósido; 22. Pelargonidina-3-suforósido; 23. Pelarginidina-3-glucosilrutinósido; 24. Peonidina-3-glucósido; 25. Peonidina-3-rutinósido; 26. Petunidina-3-arabinósido; 27. Pelargonidina-3-suforósido.

tumorales (melanoma murino, cáncer de ovario y cáncer cervical), observando una viabilidad celular inferior al de los controles (45.9, 52 y 56%, para cada tipo celular, respectivamente) a concentraciones de 0-500 µg/mL de antocianinas purificadas. Sus resultados afirman que las antocianinas purificadas ejercen un efecto prooxidante sobre estas líneas tumorales, inhibiendo así su capacidad para crecer y desarrollarse. Aunado a estos resultados, existen investigaciones recientes que apoyan las afirmaciones de los efectos preventivos (Kim y col., 2011; Kim y col., 2012) y terapéuticos (Chu y col., 2013; Zhao y col., 2013) de antocianinas de *Rubus* sobre ensayos celulares de varios tipos de cáncer, como el de colon (Kim y col., 2005), de mama (Kresty y col., 2006), de próstata (Kim y col., 2012), entre otros (Wang y col., 2008; Kula y Krauze-Baranoska, 2015).

ii **Taninos**

Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos fitoquímicos producidos como metabolitos secundarios a partir de la ruta metabólica de los flavonoides (Genebra y col., 2014). Los taninos son el segundo grupo de fenoles más abundante en la naturaleza (después de los flavonoides) y cumplen diversas e importantes actividades biológicas en la planta que los produce: actúan como defensa contra enfermedades causadas por patógenos y protegen los tejidos contra el ataque de fitófagos (Felton y col., 1989). Estos son capaces de formar complejos moleculares entre taninos, otros polifenoles, glúcidos, proteínas y minerales (Frutos y col., 2004; Aguilar y col., 2007). Históricamente han sido extraídos de distintas partes de plantas con mezclas de agua, acetona y alcoholes para usarlos en el curtido de cuero y pieles (Grasser, 1922). En la medicina tradicional se han empleado como agentes

quelantes de metales y alcaloides, antidiarreicos, diuréticos, antiinflamatorios, anticancerígenos, etc. (Johnson y col. 2013). Los taninos parecen presentar sólo efectos benéficos en la salud, sin embargo en altas dosis pueden comportarse como agentes prooxidantes e inclusive como compuestos antinutrimientales (Reddy y col., 1985; Labieniec y col., 2003). Tradicionalmente se ha clasificado a los taninos en dos grandes grupos: los taninos condensados y los taninos hidrolizables (Taiz y col., 2006). En la actualidad, la clasificación más aceptada, divide a los taninos en cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos (**Figura 5**).

a) Taninos hidrolizables o elagitaninos

Los taninos hidrolizables o elagitaninos se componen de polímeros heterogéneos conformados de ácidos fenólicos, principalmente de ácido gálico, elágico y casuarictina (**Figura 6**) y, como su nombre lo indica, se hidrolizan con relativa facilidad (Sepúlveda, 2011) y poseen menor estabilidad química que los taninos condensados (Mateos-Martín y col., 2012; Vázquez-Flores y col., 2012).

Los elagitaninos son compuestos de alto peso molecular (entre 200 y 20,000 g/Mol). Tanto, taninos condensados como hidrolizables, son producidos por tejidos vegetales para tener un sabor poco atractivo para herbívoros, sin embargo esa astringencia es tolerada por los fitófagos que poseen una saliva con alto contenido de proteínas ricas en prolina (Felton y col., 1989; Harborne, 2000; Brillouet y col., 2013). Otra de sus principales características es su alta capacidad de capturar radicales libres y prevenir el daño oxidativo producido por condiciones ambientales

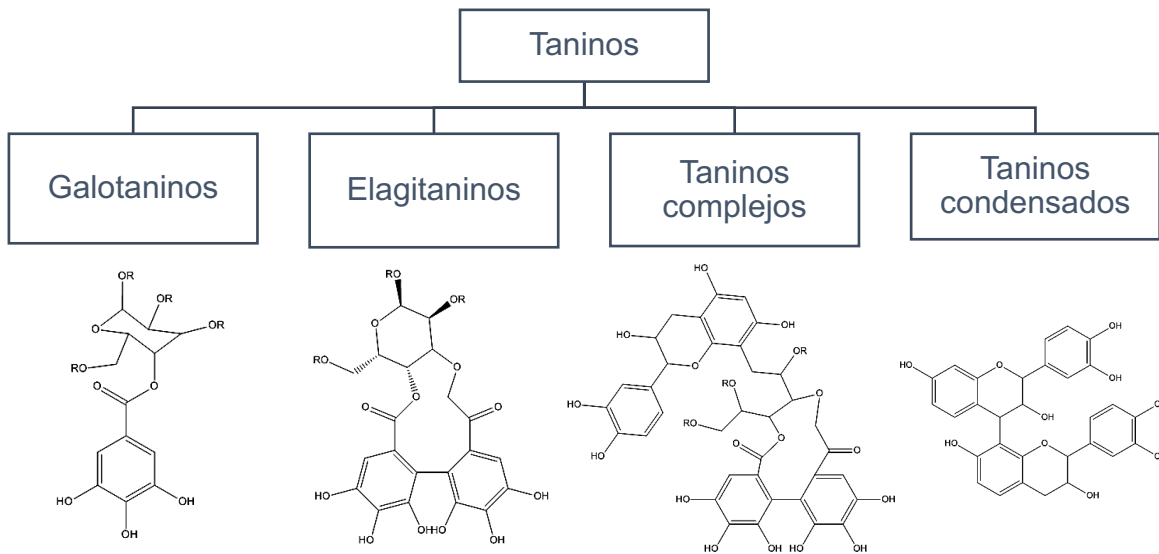


Figura 5. Clasificación de taninos acorde Khanbabaee y Van Ree (2001).

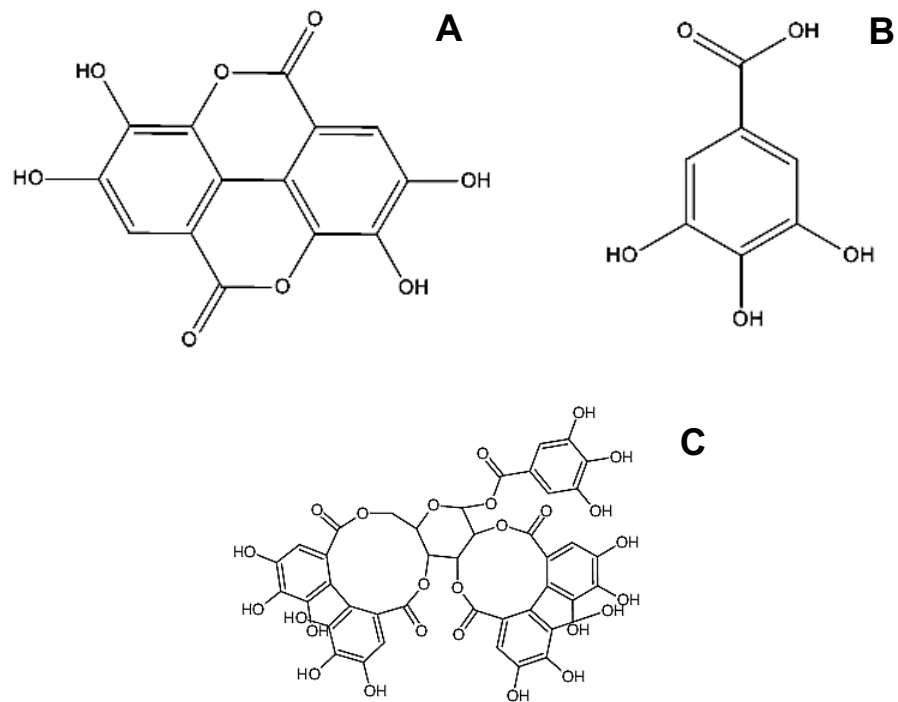


Figura 6. Ejemplo de elagitaninos monoméricos. **A:** Ácido elágico; **B:** Ácido gálico; **C:** Casuarictina.

como la sobreexposición a luz UV (Cho y col., 2009). Al consumir como parte de la dieta estructuras anatómicas de plantas con alto contenido en taninos como cortezas, dermis, semillas y ciertos tipos de frutos, generan condiciones que contrarrestan estados de estrés oxidativo y neutralizan ciertos tipos de radicales libres producidos de manera endógena en el cuerpo, es especial los de mayor peso molecular como las proantocianidinas (Ku y col., 2008; Lim y col., 2012).

b) Taninos condensados o proantocianidinas

Los taninos condensados oligómeros de proantocianidinas, picno-genoles o leucocianidias son compuestos oligoméricos y/o poliméricos de unidades de flavan-3-ols ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son producidas por las plantas por distintas razones y son de sabor astringente, ácido o amargo, acumulándose en distintos órganos y tejidos para generar diversas actividades biológicas (Mateos-Martín y col., 2012; Liu y col., 2013). Su estructura química es muy variada, formadas principalmente por unidades de catequinas y epicatequinas conformadas por polihidroxi-flavan-3-ols (Nandakumar y col, 2008) (**Figura 7**).

Estas son más abundantes en tejidos lignificantes como las semillas, siendo especialmente ricos en estos compuestos las semillas de frutos rojos, incluidas varias especies de *Rubus* (Kylli, 2011). En semillas estos compuestos son de gran

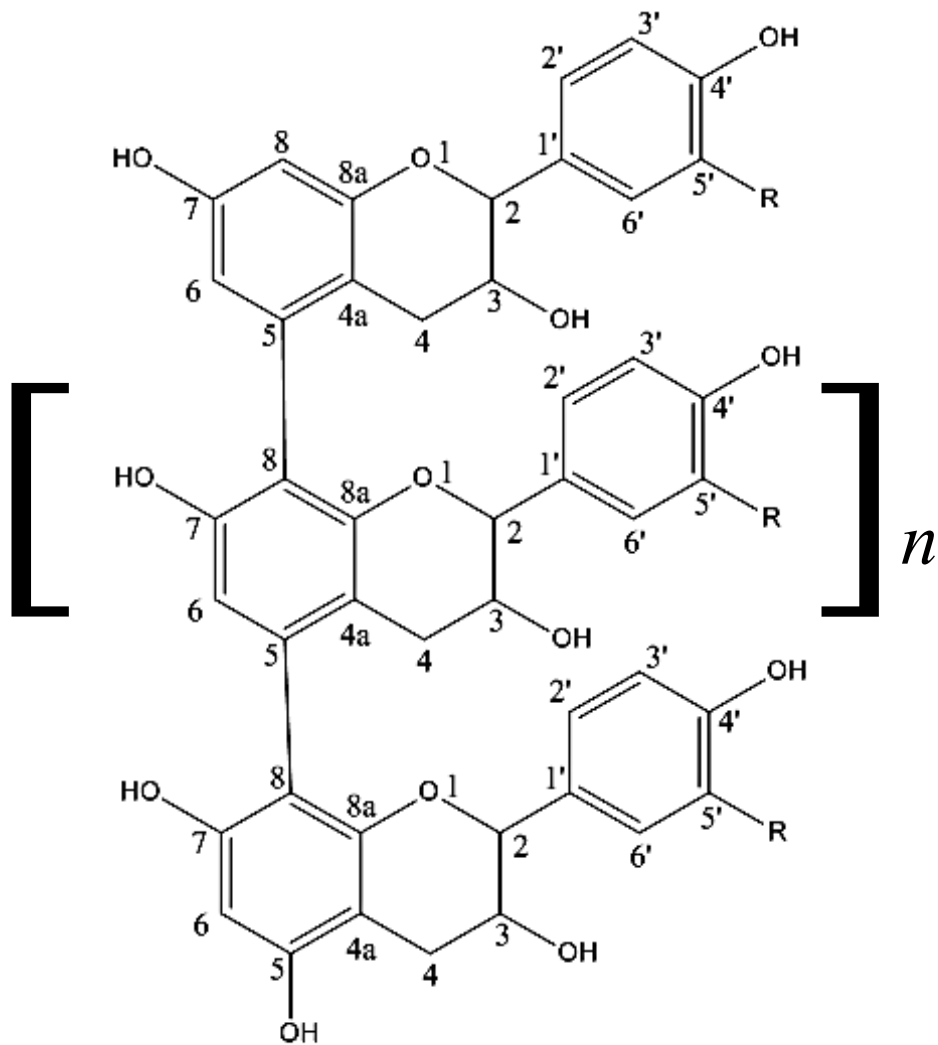


Figura 7. Ejemplo de la estructura química de una proantocianidina oligomérica (Howell, 2002).

utilidad para tolerar los procesos implicados desde la maduración del fruto hasta la germinación de esta, abarcando la fase digestiva por la que pasan muchas de las semillas involucradas en ciclos biológicos de ornitocoria, mastozoocoria o antropocoria, en la que el consumidor engulle el fruto completo y pasa a través de su tracto gastrointestinal, en el cual la dermis y pulpa del fruto son degradados y absorbidos, mientras la semilla es expulsada con el embrión intacto en una zona lejana a la planta madre (Jordano, 1984). Se ha comprobado que el consumo de frutos de *Rubus* aporta una gran cantidad de compuestos de esta naturaleza, por lo que su consumo favorece el mantenimiento de un buen estado de salud, ya que se ha comprobado por diversos estudios el efecto quimiopreventivo y como tratamiento contra ciertos padecimientos relacionados con estados de estrés oxidativo (Ramírez y col., 2009; Chen y col., 2014; Kruger y col., 2014; Zhang y col., 2014).

b Otros Compuestos y Micronutrientes

Los frutos de *Rubus* además de ser ricos en compuestos fenólicos, son fuente de otros compuestos con gran actividad biológica tanto en el mismo fruto como en los consumidores. Estas sustancias son de distinta naturaleza y composición, destacando entre ellos compuestos lipofílicos como carotenoides, ácidos grasos, esteroides y tocoferoles (Zia-UI-Haq y col., 2014). Los compuestos de esta naturaleza son reconocidos por la ciencia como componentes de membranas celulares y por ejercer actividad protectora contra radicales libres, agentes dañinos tanto físicos, como químicos y biológicos en estas (Rojas-Llanes y col., 2014). De esta manera, trabajos recientes sobre frutos de zarzamora se han focalizado en describir la composición bioquímica y las funciones biológicas de estos para aprovechar su

potencial como fuente aún mayor de compuestos nutraceuticos (Hassimoto y col., 2008; Da Fonseca-Machado y col., 2015).

Debido a dicho interés, se han identificado ciertos ácidos grasos esenciales y no esenciales en estos frutos como el ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido esteárico en proporciones variables entre especies silvestres y domesticadas (Oomah y col., 2000; Bushman y col., 2004; Ku y Mun, 2008; Fazio y col., 2013; Caidan y col., 2014; Radočaj y col., 2014; Micić y col., 2015). Además de ácidos grasos, se han encontrado cantidades importantes de tocoferoles como el α -tocoferol y la vitamina E (Oomah y col., 2000; Bushman y col., 2004; Fazio y col., 2013; Zia-UI-Haq y col., 2014) y esteroides como el β -sitosterol (Chen y col., 2014; Piotr y col., 2014); siendo todos estos comunes en membranas celulares para ejercer funciones protectoras, de permeabilidad y contra agentes dañinos.

Además de sustancias hidrofóbicas, en frutos se han encontrado elementos de naturaleza mineral que se comportan necesarios para realizar procesos fisiológicos diversos de suma importancia como fotosíntesis, maduración y producción de metabolitos en los cuales se quiere una mayor plasticidad fenotípica (Parent y col., 2013). Su presencia y proporción son muy variables acorde a diferentes condiciones ambientales y el genotipo de *Rubus* que se trate, de esta manera macrominerales (como K, P, Na y Ca) y microminerales (como Fe, Cu, Mn y Zn) se absorben de manera radicular y se acumulan en los tejidos de diferentes órganos (Ahmad y col., 2015). Ejemplo de ello es el Mg, el cual es un componente esencial de la clorofila, presente en tejidos verdes como hojas, tallos y frutos

inmaduros, siendo estos últimos órganos que al madurar acumulan Mg como residuo al disminuir la tasa fotosintética cuando este se acerca al punto máximo de producción de etileno y llegar hasta la maduración. Este proceso se observa con otros minerales, lo que vuelve a los frutos en una fuente rica y variada de micronutrientes debido a procesos relacionados con bioacumulación (Ahmad y col., 2015).

D Efecto de compuestos bioactivos de *Rubus* sobre enfermedades crónico-degenerativas (ECD)

Las enfermedades crónico-degenerativas son aquellas que son de larga duración y por lo general de progresión lenta. En la actualidad este tipo de padecimientos ha desplazado a las enfermedades infecciosas como la principal causa de muerte, dentro de las cuales destacan las fallas cardíacas, infartos, desórdenes respiratorios, diabetes y cáncer, siendo responsables de hasta el 63% de las muertes a nivel mundial. La gran mayoría de estas enfermedades están relacionadas directamente con el estilo de vida y no con agentes transmisible o hereditarios (WHO, 2015)

En el cuerpo humano los flavanoides muestran funciones quimioprotectoras y curativas al ingerirse mediante una dieta adecuada de varios alimentos vegetales como cítricos, frutos rojos, cebollas, ajos y té de distintos tipos (Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014). Sin embargo, su consumo en cantidades elevadas puede ejercer un efecto prooxidante y/o citotóxico (Heim y col., 2002; Pérez-Trueba, 2003), ya que diversos trabajos *in vivo* e *in vitro* han mostrado estas consecuencias al ser suministrados en dosis altas (Cruz-Pardos, 2000; Pérez-Trueba, 2003). Estudios

epidemiológicos y clínicos han demostrado que los flavonoides pueden prevenir la aparición de tumores a través de la interacción con varios genes y enzimas (Chahar y col., 2011). Al parecer, estas sustancias bioactivas pueden afectar algunos estados de carcinogénesis como la iniciación, promoción y progresión, lo que incluye la inactivación de carcinógenos, mejorando procesos de reparación de ADN y reduciendo el estrés oxidativo (Mertínez-Flórez y col., 2002; Sarabia-Cadena y col., 2013; Ferreira, 2014). Durante la progresión, pueden ser capaces de inducir apoptosis, inhibir angiogénesis, exhibir actividad antioxidante o prooxidante y generar citotoxicidad sobre células cancerígenas (Olejnik y col., 2010; Chahar y col., 2011; Majewski y col., 2012; Zalega y Szostak-Węgierek, 2013).

Se ha probado la eficacia de flavonoides como agentes preventivos de enfermedades neurológicas como Alzheimer, Parkinson y demencias en años recientes, puesto que se ha demostrado que distintos flavonoides ayudan a regular la función neuronal y proteger estos y otros tejidos del daño generado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (Haenen y col., 1997; Vauzour y col., 2008; Macready y col., 2009; Prasain y col., 2010; Ray y col., 2012; Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014). Diversos trabajos han manifestado que una dieta rica en estas sustancias genera un efecto benéfico en las actividades cognitivas en humanos, probablemente a través de neuroprotección y neuroregeneración (Youdim y Josheph, 2001). La multitud de efectos resultante del consumo de flavonoides conducen a dos procesos benéficos en paralelo: el primero de ellos es la regulación de las señales neuronales en cascada que resulta en la inhibición de apoptosis celular que es causada por la acción de sustancias neurotóxicas. En

segundo plano, los flavonoides juegan un papel neurovascular, puesto que pueden generar cambios en el flujo sanguíneo en el cerebro, con lo cual pueden inducir angiogénesis. Este proceso es de suma importancia para la nutrición y oxigenación de las células cerebrales y las funciones que realizan. A pesar de los resultados obtenidos, se conoce poco acerca de los mecanismos que ejercen los flavonoides y otros compuestos minoritarios de *Rubus* para llevar a cabo estas acciones (Prasain y col., 2010).

1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas con el desarrollo de procesos de multiplicación descontrolada de células con mecanismos fisiológicos anormales. Generalmente ocurre cuando una célula sufre una serie de mutaciones consecutivas que la llevan a convertirse en un riesgo para el mismo organismo, puesto que estas pierden la capacidad de inducir su muerte por medios naturales como la apoptosis, pudiendo o no, colonizar otros tejidos y/u órganos, afectando posteriormente la morfofisiología de estos. La formación de neoplasias o tumores son las causantes del desarrollo de enfermedades oncológicas, debido a que su crecimiento compite por recursos y espacio con los tejidos sanos aledaños, limitando las funciones que cumplen estos hasta generar su incapacidad parcial o total. Además, muchos de los tipos de tumores tienen la capacidad de migrar hacia órganos distantes, anclarse en ellos y comenzar a producir nuevas neoplasias, a este proceso se le conoce como metástasis (ACS, 2015a).

La etiología de un padecimiento oncológico puede deberse a uno o más factores detonantes, puesto que no existe una causa única para la generación de

una célula tumoral, ya que existen diversos factores de riesgo, donde los agentes ambientales representan más del 90% del origen de los casos y menos del 10% por predisposición genética (Anand y col., 2008). Sin embargo, numerosos estudios han relacionado a fenómenos de estrés oxidativo con la capacidad de producir células cancerígenas, puesto que en dichas condiciones, los radicales libres como las ROS y RNS tienden a generar daño de las estructuras celulares incluyendo al ADN, por lo que se pueden presentar mutaciones en genes clave del control del ciclo biológico y otras funciones vitales de las células (Varusaner y col., 2012; Zhang y col., 2015).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015) ha dado a conocer que una de cada tres personas será diagnosticada con algún tipo de cáncer en determinado momento de su vida, siendo esta una de las principales causas de muerte en el mundo, donde cerca del 70% de los pacientes diagnosticados con algún tipo de tumor sufrirá de algún tipo de cáncer relacionado con el estilo de vida, como el tabaquismo, alcoholismo, falta de actividad física, sobreexposición a rayos solares, sobrepeso y una dieta pobre en alimentos no procesados. En el cuerpo humano se han identificado más de 200 tipos de cáncer, los cuales se clasifican en dos grandes categorías: 1) se producen como tumores malignos; 2) se producen como tumores benignos. Dentro de los tipos de cáncer más comunes se encuentran los relacionados con tejidos dérmicos, pulmonares, mamarios y colorrectales, sin embargo, prácticamente ningún tejido en el cuerpo está exento de producir o desarrollar algún tipo de neoplasia, incluyendo tan vulnerables como el sistema endócrino o tan protegidas como el sistema nervioso central (SNC) (INC, 2010; ACS, 2015b).

a Cáncer en el sistema nervioso central (SNC)

El Sistema Nervioso Central (SNC) es el conjunto de tejido nervioso del que se compone el encéfalo (cerebro) y la médula espinal (Harrison, 2006). Se trata de un sistema muy complejo propio del reino animal, responsable de captar estímulos externos y procesarlos para poder reaccionar adecuadamente a situaciones dadas por el ambiente (Iglesias y col., 2015). Por lo general, la aparición de neoplasias o tumores en el SNC es muy poco frecuente (10-17 casos clínicos por cada 100,000 habitantes) (ACS, 2015a). Aproximadamente el 50% de los casos reportados se trata de tumores primarios originados dentro del propio SNC y el resto se trata de tumores de invasión generados por metástasis. Los tumores primarios del SNC surgen a partir de células cancerosas derivadas de tejidos neuroepiteliales, meníngeos y otros menos frecuentes (Iglesias y col., 2015).

i Glioma

Se denomina glioma a un conjunto de neoplasias generadas como tumores primarios en células neuroepiteliales como astrocitos, oligodendrocitos, epéndimo, plexos coroideos, neuronas y células embrionarias (Harrison, 2006). Dentro de los gliomas más comunes se encuentra el astrocitoma. Este padecimiento representa cerca del 20% de los casos de pacientes con tumores primarios de cerebro, el cual es tratado con remoción quirúrgica, quimioterapia y radioterapia, con una supervivencia media menor de 1 año en pacientes con estados avanzados después de un tratamiento. Los gliomas se clasifican en cuatro grupos acorde al avance que

tenga la enfermedad al ser diagnosticada el paciente, estos son: I) astrocitoma de bajo grado; II) astrocitoma de grado intermedio; III) astrocitoma anaplásico; y IV) astrocitoma multiforme o glioblastoma multiforme, siendo este último el más frecuente de los tumores malignos, representando dos terceras partes de los astrocitomas en cerebros de adultos (ACS, 2015). La Sociedad Americana del Cáncer (ACS) estima que para el 2015 se diagnosticaron 22,850 nuevos casos de cáncer en el SNC alrededor del mundo, de las cuales 15, 520 morirán a consecuencia de este. Estas cifras no incluyen las neoplasias benignas, las cuales elevan aún más la cantidad de casos registrados.

Las causas para desarrollar glioma en algún tipo de célula neuroepitelial son poco claras, sin embargo, pacientes que sufrieron de neurofibromatosis, esclerosis tuberosa, síndrome de Li-Fraumeni y síndrome de Hippel-Lindau, son más propensos a desarrollar neoplasias primarias en el SNC (ACS, 2015a). Por ejemplo, el síndrome Li-Fraumeni es causado por cambios en el gen supresor de tumores Tp53, el cual, en su forma silvestre evita el crecimiento de células con ADN dañado. Cambios en este gen incrementan el riesgo de desarrollar tumores cerebrales (particularmente de gliomas) (Varley, 2003). Sin embargo, el estrés oxidativo se ha asociado a la formación de células gliales cancerígenas por daño directo o indirecto sobre oncogenes (Tsai y col., 2012; Quin y col., 2015).

Para el estudio *in vitro* de gliomas se han generado varias líneas celulares a partir de muestras murinas y humanas. Estas herramientas han sido de gran utilidad para pruebas de fármacos potenciales de distintas fuentes, tratamientos con

nanopartículas, invasión, morfología y demás procesos celulares (Barth y Kurt, 2009). Algunos de los modelos más utilizados son las líneas C6 y RG2:

C6: El glioma C6 fue producido por Benda y col., 1968 y Schmideck y col., 1971 en el Sweet's laboratory en el Hospital General de Massachusetts (MGH) siendo esta la línea 6 de un experimento clonal de ratones Wistar en un periodo cercano a los 8 meses. Cuando los ratones mostraron signos neurológicos se les extirparon los tumores y se cultivaron en medio, donde se mostró que producían en gran cantidad la proteína S-100 (proteína expresada por el sistema nervioso central, importante para la motilidad, invasión y polimerización de tubulina, reordenamiento cromosómico y su sobreexpresión se relaciona con metástasis tumoral). El glioma C6 se compone de una población pleomórfica de células con núcleos de forma variable. Se ha reportado que esta línea presenta mutaciones en locus de algunas proteínas iniciadoras del ciclo celular, específicamente en la fase G1 (p16/Cdkn2a/lnk4a) (Schlegel y col., 1999), inexpressión de ARNm de p16 y p19ARF y genotipo silvestre para p53 (Asai y col., 1994). Comparando esta línea con astrocitos normales, también presentan un aumento en la expresión de los genes PDGF β , IGF-1, EGFR y Erb3/Her3, al igual que en gliomas humanos (Morford y col., 1997, Gou y col., 2003, Heimberg y col., 2005). Este es el modelo de glioma que se ha venido usando en experimentos neurooncológicos para evaluar eficacia terapéutica de una gran variedad de modalidades, incluyendo la quimioterapia (Doblas y col., 2007, Di Giacomo y col., 2012), terapia antiangiogénica (Solly y col., 2008), inhibidores de proteosoma (Ahmed y col., 2008), tratamientos con toxinas (Zhao y col., 2008), radioterapia (Sheehan y col., 2008), terapia fotodinámica

(Mannino y col., 2008), terapia viral oncológica (Yang y col., 2004) y terapia génica (Tanriover y col., 2008).

RG2: El glioma RG2 fue producido en el laboratorio Koestner's en la Universidad del Estado de Ohio mediante la administración de *N*-etil-*N*-nitrosourea (ENU) (50 mg/kg de peso corporal) a una rata Fisher 344 embarazada en el día 20 de gestación. El crecimiento *in vitro* mostró núcleos fusiformes y cuerpo celular poligonal. La progenie tratada con ENU subsecuentemente desarrolló tumores, que fueron clonados en Wechsler en Alemania y donde uno de estos clones fue designado como RG2 (glioma de rata 2, por sus siglas en inglés). Este tipo de glioma tiene un patrón invasivo y de crecimiento con respecto a otros gliomas. Se ha establecido que estas células sobreexpresan los precursores de ARNm de PDGF β , IGF-1, Ras y Erb/HER3 y ciclina D2. Presentan genotipo silvestre de p53 y concurrente pérdida de la expresión de locus del gen p16/Cdkn2a/lnk4. Regularmente se usa esta línea en gran variedad de tratamientos preclínicos para evaluar cambios en la permeabilidad vascular, disrupción de la barrera hematoencefálica, terapia antimutagénica, terapia génica, quimioterapia y terapia radionuclear (Shen y col., 2004).

Los tratamientos para neoplasias de este tipo son variados y se aplican dependiendo del estado de avance del tumor, la región donde se desarrolla y el tipo de células de las que se compone (Ha y col., 2015). Dentro de estos destaca el tratamiento genético, que se enfoca en actuar sobre lesiones cromosómicas; las remociones quirúrgicas asistidas son las técnicas más usuales para deshacerse de los tejidos dañados cuando éste está en un punto accesible; las terapias por

radiación o radioterapias, son igualmente variables, resaltando entre ellas la radiación confocal tridimensional (3D-CTR), la radiación de intensidad modulada (IMRT) y la terapia por haz de protones, las cuales son poco invasivas y de resultados prometedores; otro tratamiento de gran peso es la quimioterapia, la cual es sumamente diversa, ya que utiliza complejos anticancerígenos vía oral e intravenosa. Estas sustancias entran al torrente sanguíneo y llegan a los tejidos diana, sin embargo, en el SNC la barrera hematoencefálica impide el paso de muchos agentes extraños; en otros casos la aplicación de los fármacos es directamente aplicado sobre el tejido cerebroespinal. Por lo general, la quimioterapia es usada en tumores de crecimiento acelerado, posterior a una remoción quirúrgica y a la par con terapias de radiación (ASC, 2015a).

En México los fármacos más usuales en quimioterapia de gliomas son el carboplatino, cisplatino, vincristina y temozolamida, siendo usados de manera individual o en combinación con otros compuestos (Stepanenکو y col., 2015). La temozolamida es especialmente agresiva contra varios tipos de glioma, pero sus altos costos hacen que los pacientes elijan uno o más de los demás fármacos mencionados, los cuales muestran resultados efectivos contra distintas neoplasias gliales, pero además afectan tejidos sanos tanto del SNC como de otros que se muestren vulnerables (Barciszewska y col., 2015). Este hecho ha orillado a los investigadores a buscar tratamientos alternativos de fuentes con potencial anticancerígeno y que muestren efecto citotóxico sobre células tumorales, que causen el menor o nulo daño sobre células y tejidos sanos (De Castro-De Pardo y col., 2006). Dichas características son distintivas de los compuestos con actividad

biológica (principalmente antioxidante) de los frutos de *Rubus* como los mencionados flavonoides, en particular antocianinas y proantocianidinas, además de compuestos hirofóbicos y micronutrientes minerales (Fantini y col., 2015; He y col., 2015; Li y col., 2015; Lila y col., 2015; Pekmez y col., 2015; Quin y col., 2015). Aunado a esto, investigaciones recientes en el campo de nanomedicina sobre modelos *in vitro*, como el los de nanogeles y nanopartículas metálicas, ofrecen resultados prometedores para el tartamiento de gliomas y otros tipos de cáncer (Bustamante-Mamani y col., 2012a; Bustamante-Mamani y col., 2012b; Chiarelli y col., 2015).

IV JUSTIFICACIÓN

Los frutos de *Rubus*, como moras y zarzamoras, son ricos en fitoquímicos con actividad antioxidante como antocianinas, proantocianidinas, elagitaninos y tocoferoles, los cuales son recomendados en la dieta para mantener niveles bajos de agentes oxidantes en el cuerpo y con ello protegernos de padecimientos transmisibles y no transmisibles relacionados con estados de estrés oxidativo, lo que convierte a estos frutos en excelentes fuentes nutracéuticas.

En México, en la última década se ha optado por cultivar especies de origen extranjero, dejando de lado las alrededor de 30 especies nativas que se distribuyen en el territorio nacional, incluyendo las que subsisten en la serranía del estado de Sinaloa. Estas especies, en comparación con las domesticadas, poseen una gran variedad de compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante a los cuales se les ha prestado especial atención para combatir distintos padecimientos, incluyendo los crónico-degenerativos como el cáncer.

IV HIPÓTESIS

Los compuestos antioxidantes aislados y caracterizados de frutos de dos especies de *Rubus* silvestres del estado de Sinaloa mostrarán efectos bioactivos en ensayos *in vitro* bioquímicos y biológicos.

V OBJETIVOS

A Objetivo General

Identificar los compuestos bioactivos de dos especies de *Rubus* nativas del estado de Sinaloa, así como su potencial nutracéutico sobre líneas celulares de cáncer de cerebro murino.

B Objetivos Específicos

- 1 Identificar taxonómicamente dos especies de *Rubus* nativas de El Palmito, Concordia, Sin.
- 2 Aislar, caracterizar y cuantificar compuestos bioactivos de dos especies de *Rubus* nativas de Sinaloa.
- 3 Evaluar la capacidad antioxidante de fitoquímicos de *Rubus* (ORAC, Celular)
- 4 Determinar la citotoxicidad de fitoquímicos de *Rubus* en dos líneas celulares de glioma murino.
- 5 Medir el efecto de peroxidación lipídica y genotóxico de los compuestos bioactivos sobre líneas celulares de glioma murino.
- 6 Medir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en líneas celulares de glioma murino expuestas a compuestos bioactivos y nanomateriales de hierro.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A Materiales

Se colectaron frutos de dos especies del género *Rubus* dentro de la Reserva de la Chara Pinta (N 23° 48' 48.4", O 105°50' 15.1 " a 2450 msnm), dentro del terreno ejidal de El Palmito, Concordia, entre los límites de Sinaloa y Durango (**Figura 8**). Aproximadamente se recolectaron 2.5 kg de *Rubus liebmannii* y 2 kg de *Rubus palmeri* el 1° de julio del 2014. El criterio de selección fue el estado de madurez, ya que sólo se escogieron materiales de color morado intenso a negro. El fruto se transportó inmediatamente después de la colecta en bolsas de cierre hermético y se congeló a -80 °C para posteriormente ser liofilizado y almacenado hasta su utilización.

Para los ensayos realizados se utilizaron solventes químicos como: etanol (EtOH), metanol (MeOH), acetato de etilo (AET), éter, acetona y acetonitrilo grado ACS y HPLC. Ácido tricloroacético (ATC), ácido fórmico (AFM), Folin-Ciocalteu (FC), fluoresceína. Para derivatización de carbohidratos se utilizó *N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetoamida* (BSTFA) (Sigma-Aldrich) y piridina. Además, se utilizaron estándares de ácido gálico, Trólox y catequina. Para el cultivo celular se utilizó medio de cultivo DMEM, bicarbonato de sodio (NaHCO₃), piruvato de sodio (C₃H₃O₃Na), medio en polvo Eagle's Medium, suero fetal bobino (SFB) y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina). Stock de nanopartículas (97:2:1, v/v/v, agua destilada, albúmina al 5%, nanopartículas de hierro de 30 nm al 10%). Tripsina y buffer salino de fosfato (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO), azul de tripano, eosina, hematoxilina, gelatina



Figura 8. Sitio de colecta dentro del terreno ejidal de El Palmito, Concordia, Sinaloa.

glicerina y agua amoniacal, cristal violeta, rojo neutro, paraformaldehido (PFA), ácido acético (AAc), ácido tiobarbitúrico (ATB), ácido tricloroacético (ATC) y 2',7'-

diclorofluoresceína (DCFH), el Kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep de AXYGEN BIOSCIENCES., amortiguador TBE, bromuro de etidio (BR), geles de poliacrilamida.

B MÉTODOS

1 Identificación de las especies silvestres de *Rubus*

Para la identificación de las especies silvestres de *Rubus* se realizó un análisis y registro *in situ* de los caracteres taxonómicos idóneos de las muestras pertenecientes a ambas especies. Además se colectaron muestras representativas con las partes anatómicas idóneas como flores, frutos, tallos y hojas. Estas muestras biológicas se seleccionaron de plantas que crecían juntas en la misma zona. Para la clasificación se tomaron en cuenta tanto tallos estériles (turión) como tallos fértiles, cuidando que estos procedieran de la parte central de la planta, ya que en esta región es donde se presenta menor variabilidad fenotípica de las mismas estructuras, como lo han establecido distintos botánicos a través de sus estudios (Weihe y Nees; 1822; Focke, 1877; Boulay, 1893; Sudre, 1908; Weber, 1973), además de otras normas correctas de colección de *Rubus*: dos hojas de la parte media del turión con el correspondiente trozo del mismo; una inflorescencia que corresponda a la misma planta de donde se colectó el turión; los frutos deben de ser colectados en la parte inicial de la maduración con permanencia de flores en el ápice (Weber, 1992).

Los caracteres registrados y analizados se analizaron en la sala Bletia del Herbario Nacional de la UNAM y se compararon con los reportados previamente

para *Rubus* dentro de su colección botánica y con bases de datos de Norteamérica, México, la Sierra Madre Occidental y Sinaloa, como los son Tropicos (www.tropicos.org), KEW: World Checklist of Selected Plant Families (apps.kew.org), Catalogue of Life (www.catalogueoflife.org), Global Biodiversity Information Facility (data.gbif.org), The New York Botanical Garden Virtual Herbarium (data.gbif.org), JSTOR Plant Science (plants.jstor.org), Encyclopedia of Life (www.eol.org), Biodiversity Heritage Library (www.biodiversitylibrary.org) y resultados disponibles del proyecto Flora Mesoamericana (www.tropicos.org/Project/FM). Además, se pudo hacer una comparación directa de las muestras con las del Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa y del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México empleando equipos de microscopía óptica con ayuda de especialistas en la familia botánica.

2 Liofilización de frutos

Para liofilizar los frutos de zarzamora, estos fueron lavados, desinfectados y almacenados a -80°C por 12 h, para posteriormente ser colocados en una liofilizadora FreeZone 6 Liter Benchtop (Freeze Dry Systems, Labconco, USA) durante ~80 h. Una vez liofilizados los frutos, estos fueron almacenados en recipientes herméticos hasta su utilización.

3 Composición química

a Proteínas

Para la evaluación del contenido de proteínas se utilizó el método 46.12 de la AOAC (1999). 0.2 g de fruto liofilizado se colocaron en tubos de digestión microKjeldhal; se adicionaron 1.625 g de catalizador (K_2SO_4 y $CuSO_4$, 10:1, p/p) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se dejaron en digestión por 6 h a $550^\circ C$. Transcurrido este tiempo se sacaron los tubos del digestor, se les agregaron 10 mL de agua destilada y se agitaron para homogenizar la mezcla. Posteriormente se agregaron 15 mL de ácido bórico a la mezcla, 3 gotas de rojo de metilo (como indicador). Los tubos, se colocaron en el destilador y se le añadió hidróxido de sodio al 40% hasta que la mezcla cambió de color (verde a pardo oscuro). Finalmente, se colectó el Nitrógeno obtenido y se tituló con HCl al 0.08 N. La prueba se realizó por triplicado para ambas especies.

b Lípidos

Para la evaluación del contenido de grasa total, se utilizó el método 920.39 C de la AOAC (1999). Se pesaron 1.5 g de fruto liofilizado y se colocaron en papel filtro Whatman #1 y se introdujo en dedales de extracción, después fueron colocados en equipos Soxhlet utilizando éter como solvente. La prueba se realizó por triplicado para ambas especies.

c Cenizas

El contenido de cenizas se evaluó de acuerdo al método 925. 098 reportado por la AOAC (1999). 1 g de fruto liofilizado se colocó en un crisol (previamente puesto a peso constante); el crisol fue colocado en una mufla a $550^\circ C$ por 12 h. La

ceniza de color blanco-grisáceo se enfriaron y pesaron. Los ensayos se realizaron por triplicado para ambas especies.

d Humedad

Para determinar el contenido de humedad se utilizó el método 44.15 de la AOAC (1999), donde 1 g de muestra se colocó a 130°C por 1 h en una estufa para eliminar el agua de la muestra. Transcurrido este tiempo se calculó el % de humedad.

c Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia de los demás macrocomponentes de los frutos de zarzamora silvestre.

4 Caracterización de Minerales por Espectrometría de Absorción Atómica (EAA)

Para la cuantificación de minerales se utilizó la metodología descrita por Frías-Espericueta y col. (2014) con algunas modificaciones, donde 1 g de muestra de fruto liofilizado se calcinó en crisoles de porcelana por 2 h a 550°C dentro de una mufla. Transcurrido este tiempo se sacaron de la mufla y se enfriaron para llevarlos a peso constante. Posteriormente, se agregaron 5 mL de agua regia (HCl:HNO₃, v/v: 1:1) y se dejaron reaccionar por 1 h a temperatura ambiente. Después la mezcla se filtró y se aforó a 50 mL con agua grado Mili-Q. Por último se inyectaron al sistema de espectrometría de absorción atómica (EAA) (Modelo VARIAN, por inserción directa en flama. El análisis se realizó por triplicado para ambas especies.

5 Fraccionamiento de compuestos bioactivos de zarzamora

a Extracto Crudo (EC)

Para la obtención del extracto crudo se utilizó la metodología propuesta por Cuevas-Rodríguez y col. (2014) con modificaciones. Se tomaron 100 g de fruto liofilizado y se mezclaron con 500 mL de MeOH al 80% acidificado con 0.3% de ATC (MeOH:H₂O:ATC, 80:19.7:0.3, v/v/v) y se agitaron por 24 h. La mezcla fue decantada y el sobrenadante colocado en un matraz; el sedimento se expuso de nuevo a la mezcla metanólica acidificada para agitar de nuevo por 24 h. Posteriormente se juntaron los sobrenadantes, se filtraron con papel Whatman #1 y se colocaron en un rotavapor (Buchi, Modelo R-100, Flawill, Suiza) para eliminar el MeOH de la mezcla (**Figura 9**).

b Separación de la Fracción No Polar (FNP)

Para la obtención de la fracción no polar (FNP), el extracto crudo fue particionado con acetato de etilo (AET:1:1: v/v) dentro de un embudo de separación. Este procedimiento se realizó por duplicado. Posteriormente, las dos fases fueron colocadas en matraces y el solvente eliminado en un rotavapor (Buchi, Modelo R-100, Flawill, Suiza) (**Figura 9**).

c Fracción Rica en Polifenoles (FP) y Fracción de Carbohidratos (FCHO)

Para el fraccionamiento de polifenoles y carbohidratos se utilizó la metodología descrita por Cuevas-Rodríguez y col (2010) (Figura 9). 100 g de resina Amberlite XDA-7 (SIGMA, MO,USA) se ambientaron con 100 mL de agua acidificada

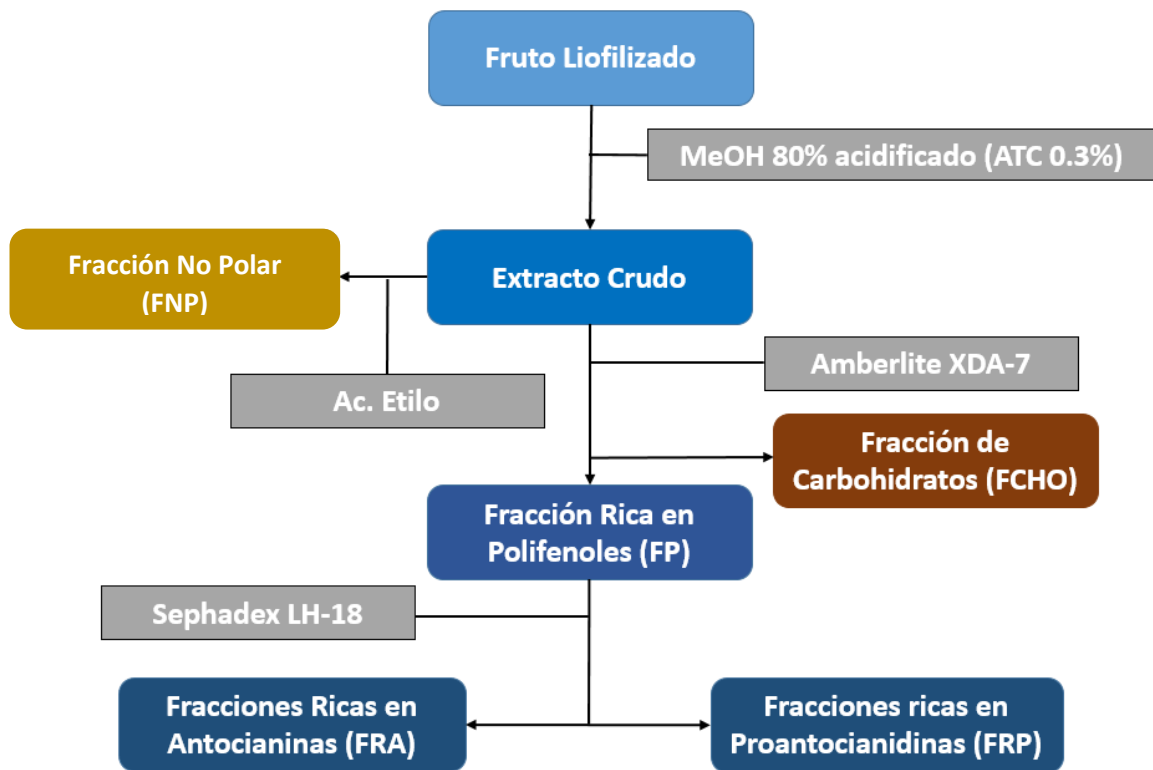


Figura 9. Proceso de obtención de fracciones de frutos liofilizados de *R. liebmannii* y *R. palmeri*.

[Agua:ácido trifluoroacético (H₂O:TFA; 99.7:0.3, v/v)]. El extracto metanólico de zarzamoras se mezcló con la resina activada y se dejaron en agitación durante 30 min a 150 rpm. Transcurrido este tiempo se colocó la resina junto con la mezcla en una columna de vidrio de 300 x 25 mm. Se realizaron lavados con metanol al 80% para lavar la resina y separar carbohidratos, minerales y fenólicos libres y el agua fue colectada para posteriormente congelarse, y liofilizarse para obtener la fracción rica en carbohidratos.

Finalmente, de la columna se eluyeron los compuestos fenólicos con 1 L de MeOH acidificado hasta decolorar la resina. La fracción obtenida se puso a evaporación en un rotavapor (Buchi, Modelo R-100, Flawill, Suiza) para eliminar el MeOH de la mezcla, obteniendo de esta manera la fracción rica en polifenoles (FP); esta mezcla se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización (**Figura 9**).

i. Fracción de Rica en Antocianinas (FRA) y Proantocianidinas (FRP)

Para la obtención de la fracción rica en antocianinas, primeramente se activaron 20 g de la resina Sephadex LH-20 con 100 mL de MeOH acidificado. La resina se colocó en una columna de separación de 300 x 25 mm 2 g de la fracción rica en polifenoles se diluyó en 20 mL de MeOH acidificado. La mezcla se agregó a la parte superior de la columna y una vez adsorbida la mezcla de polifenoles se añadieron 500 mL de MeOH acidificado a la columna y se inició la recuperación de fracciones metanólicas (5 fracciones de aproximadamente 100 mL cada una). Las FRA se pasaron por un rotavapor (Buchi, Modelo R-100, Flawill, Suiza) para eliminar el MeOH de la mezcla y posteriormente fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C

hasta su utilización (**Figura 9**). Después de eluir la FRA con MeOH acidificado de la columna, fueron añadidos 200 mL de acetona al 70% al sistema y se eluyeron dos fracciones ricas en proantocianidinas (FRP); estas se pasaron por rotavapor para eliminar la acetona y en seguida se liofilizaron (**Figura 9**) hasta su utilización.

6 Caracterización de las Fracciones Obtenidas de Zarzamoras Silvestres

a Identificación de antocianinas

i Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para el análisis de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), se pesaron 5 mg de extracto liofilizado y se disolvieron en 1 mL de metanol grado HPLC. La mezcla se pasó por filtros de nylon (Millipore, Darmstadt, Alemania) de 0.22 μm y se colocaron en viales ambar. Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (PerkinElmer, MA, USA) y el software Chromera. Se empleó una columna Supelcosil LC-18 YMC-Pack ODS-AM (250 x 4.6 mm) con un gradiente de elusión como fase móvil A: 5% agua acidificada (95:5, v/v: ácido fórmico) y como fase móvil B: metanol al 100%, con un flujo de 1 mL/min con un gradiente de 90, 85, 75, 70, 40, 90 y 90% del solvente A a 0, 5, 15, 20, 25, 45, 47 y 60 min, respectivamente, a una temperatura de 25°C y realizando la lectura a 520 nm. Como estándar de referencia se tomaron 5 diluciones cianidina clorada (Sigma-Aldrich, St., Louis, MO) y una mezcla de antocianinas (Cuevas-Rodríguez y col, 2010) previamente identificadas. Todos los extractos se analizaron por triplicado.

ii Cromatografía líquida-ionización por electrospray-espectrometría de masas (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS))

En análisis LC-ESI-MS se realizó con el espectrómetro de masas LCQ DEca XP (Thermo Finnigan Corp., San Jose, CA), MS versión 1.3 SRI, ESI en ion modo positivo (m/z 100-1000), con detector fotodiodo de arreglo (PDA) (200-600 nm), versión 1.2, autosampler versión 1.2 y software Xcalibur para el procesamiento de datos. El voltage de spray fue de 10 kV y la temperatura capilar fue de 250°C. El análisis LC-MS se llevó a cabo usando la misma fase móvil para el análisis por HPLC, el flujo fue de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección de muestra o estándar fue de 5 μL en un gradiente del solvente A de 10, 30, 60, 10%, a los 0, 5, 30 y 35 min, respectivamente. La temperatura de la columna Supelcosil LC-18 (150 x 4.6 mm) y las muestras se mantuvo a 20°C. El análisis LC-MS/MS se determinó mediante LT-tiempo de vuelo (LC-time-flight). La obtención de datos de MS/MS fue determinado por el software MassLynx 4.0 (Waters Corporation). Estándares comerciales se prepararon a 0.25 mg/mL y las muestras a 5 mg/mL, diluidas en 1 mL de MeOH al 100% y filtradas [0.22 μm politetrafluoroetileno (PTFE)] antes de la inyección para comparar tiempos de retención (RT) y valores m/z para las fracciones de antocianina.

b Identificación de proantocianidinas:

i HPLC

Para el análisis por HPLC, se siguió el procedimiento de antocianinas. El gradiente de elusión de fase móvil de 5% ácido fórmico en agua grado HPLC (A) y

0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). El flujo de (1 mL/min) constante con un gradiente de paso de 100, 95, 70, 40, 10, 10 y 100% del solvente A a 0, 40, 45, 50, 55, 60 y 70 min, respectivamente, a temperatura de 25°C y realizando la lectura a 280 nm. Como estándar de referencia se tomaron 5 diluciones de catequina. Todos los extractos se analizaron por triplicado.

ii Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y carbono (^{13}C)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) se obtuvieron con ayuda de un espectrofotómetro Bruker a 400 y 50 Hertz (Hz). Las muestras se diluyeron en metanol deuterado (CD_3OD) y dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) y tetrametil salino (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) fueron expresados en partes por millón (ppm). Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz en todos los casos. El análisis por RMN ^1H se corrió a 200 y 400 Hz, mientras que el de ^{13}C corrió a 50 y 100 Hz.

c Análisis por GC-MS de la fracción No Polar (FNP)

El perfil de ácidos grasos y otros compuestos no polares fue determinado con el método reportado por Ahumada-Santos y col. (2013), donde se tomaron 5 mg de muestra y se diluyeron en 1 mL de MeOH grado HPLC. La composición de ácidos grasos fue obtenida corriendo en el cromatógrafo de gases Agilent (GC-6890N) (Agilent Technology, Inc. CA, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo 5973). 5 μL de la mezcla fueron inyectados usando helio como gas acarreador a

través de una columna QUADREX 007 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) (Quadrex Copr., Woodbridge, CT, EUA). Para el análisis, la temperatura empleada por el inyector fue de 250°C; del horno 60°C, un gradiente de elevación de 5 °C/min hasta los 200°C y subiendo 10°C/min hasta los 275°C, manteniendo esta temperatura constante hasta el final de la corrida (60.5 min). El detector de masas fue operado en el modo de impacto electrónico con 70 eV de energía. La temperatura del detector y cuadrupolo fue mantenida en 245 y 150°C, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de la base de datos Nist08.

d Derivatización y análisis por GC-MS de la fracción rica en carbohidratos

Se empleó la metodología propuesta por Xiang y col. (2013) haciendo las pertinentes modificaciones, donde 10 mg de la fracción liofilizada de carbohidratos se mezclaron en un vial ámbar de 2 mL con 50 μ L de BSTFA como derivatizante y 50 μ L de piridina. En seguida se selló el vial con parafilm y se sonicó por 5 min para después colocarlo en horno a 70°C para dejarlos reaccionar por 4 h. Por último se resuspendió la mezcla en 1.5 mL de hexano grado HPLC y se inyectó en el sistema GC-MS en las condiciones mencionadas para el análisis de la FNP.

7 Contenido de polifenoles totales del fruto completo, fracciones de Polifenoles (FP), Antocianinas (FRA) y Proantocianidinas (FRP)

Para determinar la concentración de fenólicos totales de los frutos de zarzamora y de los extractos se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Nurmi y col. (1996). Brevemente, soluciones de 50 μ g/mL de los

extractos se mezclaron con 0.5 mL 1 N del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitaron durante 2-5 min y se les agregó 1 mL de Na₂CO₃ al 20%, en seguida se dejó la solución en reposo por 10 min. Finalmente, la absorbancia se midió en el rango de UV-Visible con un espectrofotómetro (Synergy HT, Biotek Instrument; VT, USA) a 765 nm. El contenido total de polifenoles se calculó a partir de una curva estándar de ácido gálico y se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto en base seca (bs).

8 Capacidad Antioxidante (ORAC) del Fruto, Fracciones de Polifenoles, Antocianinas (FRA) y Proantocianidinas (FRP)

a ORAC Hidrofílico

Fue preparada la solución generadora de radicales libres (2-2'-Azobis amidinopropano) AAPH, para lo cual fueron pesados 0.207 g del reactivo y fue aforada en un matraz volumétrico de 5 mL con solución reguladora de fosfato (pH 7.4). La fluoresceína fue preparada hasta el final (ya que esta puede ser oxidada muy lentamente en condiciones ambientales) a una concentración de 0.1 µM con solución reguladora de fosfato (pH 7.4). Se realizaron diluciones de los extractos de las muestras (fenólicos libres y ligados) usando una solución reguladora de fosfato (pH 7.4) y posteriormente, fueron transferidos 25 µL de cada extracto a una placa de 96 pozos. La placa con las muestras fue colocada en el lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument) del espectrofotómetro fluorescente. Por medio de un auto-dispensador del equipo fueron agregados 150 µL de fluoresceína a cada pozo del microplato, la solución fue mezclada agitando a 1200 rpm por 20 s. La reacción fue iniciada agregando 25 µL de AAPH por medio del auto-dispensador del

equipo previamente programado. La reacción se llevó a cabo a 37°C y la fluorescencia fue medida a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión. Las condiciones de la reacción fueron optimizadas a partir de preliminares para que la reacción transcurra en un lapso de 40 min. Los datos fueron recolectados por el software del equipo. La reacción con los radicales peróxilo generaron la pérdida de la fluorescencia con el tiempo. El efecto de un antioxidante se integra por el área bajo la curva sobre la pérdida de la fluorescencia (AUC por sus siglas en ingles) ($AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOC}$). El área bajo la curva es calculada con la siguiente ecuación:

$$AUC = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 + f_i/f_4) \times CT$$

Los valores de ORAC fueron reportados como equivalentes de Trolox (ET)/100 g muestra en base seca. Fue generada una curva estándar de cinco puntos (concentración de 25 a 100 μ M) y los equivalentes de Trolox de la muestra fueron calculados usando la siguiente ecuación lineal o cuadrática (Lineal: $Y = a + bX$; cuadrática: $Y = a + bX + cX^2$) que relaciona la concentración de equivalentes de Trolox (Y) (μ M) y el área bajo la curva de la disminución de la fluorescencia (X) ($ABC_{muestra} - ABC_{blanco}$). La regresión lineal fue utilizada en un rango de 25-100 μ M de Trolox en micromoles (μ mol) por 100 g de muestra (μ mol TE/100 g (bs)) (Ou y col., 2001; Prior y col., 2005). Las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

b ORAC Lipofílico de la Fracción No Polar (FNP)

Se llevo a cabo la solubilización de compuestos lipofílico con 7% de (p/v) de de β -ciclodextrina metilada (Ciclodextrina metilada al azar, RMCD) en 50% (v/v) de acetona en agua (Huang y col., 2002; Prior y col., 2003 y 2005). El marcador

fluorescente y el AAPH fueron preparados de la misma forma como se preparó para ORAC hidrofílico. La curva estándar de Trolox y las diluciones correspondientes de cada extracto serán preparadas con acetona-agua (50%, v/v) y la RMCD al 7%. La mezcla para llevar a cabo la reacción será de 16 μ L de los extractos, 60 μ L de AAPH y 160 μ L de la DCFH. El AUC (por sus siglas en inglés) será calculado como se describió anteriormente. Los resultados obtenidos para capacidad antioxidante lipofílica serán expresados como μ mol ET/100 g de muestra seca (Prior y col., 2005) bajo la misma ecuación empleada en el ORAC hidrofílico.

9 Determinación de Actividad Antioxidante en Células HepG2 (AAC)

a Cultivo de células HepG2

Para la determinación de la actividad antioxidante sobre células HepG2 se utilizó la metodología descrita por Wilfe y col (2008). La línea celular HepG2 fue cultivada en medio de crecimiento WME (complementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 5 μ g/mL de insulina, 0.05 μ g/mL de hidrocortisona, 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomina y 100 μ g/mL de gentamicina) y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

b Ensayo de actividad antioxidante celular (AAC)

Para el ensayo de AAC, las células HepG2 se sembraron en una microplaca de 96 pozos a una densidad de 6×10^4 cel/pozo en 100 μ L en medio de crecimiento. Los pocillos externos se llenaron con 100 μ L de PBS para crear una atmósfera húmeda y reducir las fluctuaciones. Después de 24 h de incubación a 37 ° C con 5% de CO₂, se eliminó el medio de crecimiento y las células se lavaron con 100 μ L de PBS estéril. Los pocillos se trataron durante 1 h con 100 μ L de medio de tratamiento

(WME con 2 mM de L-glutamina y 10 mM de HEPES) que contiene extractos o quercetina a distintas concentraciones para ser usada como curva (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$), mas 25 μM de DCFH-DA diluida en medio de tratamiento. Cuando se empleó un posterior lavado con PBS, se realizó con 100 μL de este por pocillo. En seguida, 600 μM del agente oxidante AAPH fue aplicado a las células en 100 μL de medio de Hank (HBSS), para ser leídos en espectrofotómetro a 538 nm de medición y 485 nm de excitación a 37 °C, cada 5 min por 1 h. Cada placa incluye un triplicado de control y blanco: los pocillos de control contenían células tratadas con DCFH-DA y AAPH; los pocillos del blanco contenían células tratadas con DCFH-DA y HBSS sin AAPH (Wolf y Liu, 2008).

c Cuantificación de la AAC

Después de la sustracción del blanco a los valores iniciales de la fluorescencia, se calculó el área bajo la curva de fluorescencia frente al tiempo para determinar el valor de la AAC a cada concentración de antocianinas o proantocianidinas de ambas especies. La siguiente ecuación fue utilizada para este ensayo:

$$\text{AAC (unidades)} = 1 - (\int\text{SA}/\int\text{CA})$$

donde: $\int\text{SA}$ es el área integrada bajo la muestra en la curva de fluorescencia frente al tiempo, y $\int\text{CA}$ es el área integrada bajo el control de la curva de fluorescencia frente al tiempo. La dosis media efectiva (EC_{50}) de las FRA y FRP fue calculada por el gráfico de efectos medios del log (fa/fu) frente al log (dosis), donde: fa es la fracción afectada por el tratamiento (Unidades de AAC) y fu es la fracción no afectada (1-Unidades de AAC) por el tratamiento. Los valores de EC_{50} se

expresaron como media \pm desviación estándar utilizando conjuntos de datos por triplicado obtenidos a partir del mismo experimento. Los valores EC_{50} se convirtieron en valores de AAC, que se expresan como μM equivalentes de quercetina (EQ)/g de muestra, utilizando el valor medio de EC_{50} para la quercetina a partir de tres experimentos separados.

10 Evaluación del potencial anticarcinogénico de extractos de zarzamora sobre líneas celulares de gliomas murinos

a Preparación de Medio de Cultivo

800 mL de agua destilada se mezclaron con 3.7 g de NaHCO_3 , 110 mg de $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ y 13.37 g de medio en polvo, se ajustaron a un pH de 7.2-7.3, para agregar 100 mL de SFB desactivado y 1 mL de antibiótico. Por último se aforó la mezcla con agua destilada a 1 L. La mezcla se pasó a través de un filtro Nalgene con ayuda de una bomba y se dejó en prueba de esterilidad por 24 h en incubadora a 37 °C con CO_2 al 5%.

b Preparación de Extractos

Se prepararon soluciones stock de 34 fracciones aisladas de ambas especies de zarzamora silvestres (16 de antocianinas, 8 de proantocianidinas, 4 de la mezcla de antocianinas y proantocianidinas, 2 de la fracción rica en polifenoles, 2 de extractos no polares y 2 de carbohidratos) a una concentración de 1 mg/mL en DMEM:DMSO (99.9:0.1, v/v).

c Cultivo Celular

Para el cultivo celular, las líneas celulares obtenidas de la Colección Americana de Cultivos y Tejidos (ATCC, USA) se sembraron en cajas de cultivo de 75 cm² dentro de incubadora a 37 °C con CO₂ al 5% con ~15 mL de medio esencial DMEM hasta alcanzar una confluencia $\geq 90\%$. Al observar la densidad celular, se retiró el medio de cultivo, se hizo un lavado con PBS y se despegaron con 500 μL de tripsina. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 7 min con 500 μL de DMEM (para inactivar la tripsina). Realizado esto, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en DMEM para hacer un conteo con cámara una cámara de Neubauer de las células teñidas con azul de tripano. Por último, se sembraron células a una densidad de 4×10^4 por pozo en microplacas de 96 pozos de mitad de área y se dejaron crecer en incubadora (Mosmann y col., 1983; Denzot y col., 1986; Bonifaz y col., 1992; Cordero y col., 2005).

d Aplicación de Tratamientos

Para la aplicación de tratamientos, se prepararon 9 diluciones de cada una de las 32 fracciones de zarzamora (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 100, 250 μL del stock/mL de DMEM) y se aplicaron sobre las líneas celulares por triplicado. La primera columna de cada placa se tomó como control. Los tratamientos se realizaron en cultivos de 24 y 48 h de exposición. Cuando se seleccionaron los extractos que generaron mayor daño citotóxico, se realizaron pruebas con nanopartículas a una concentración de 0.1 μL del stock sobre el control y los candidatos de extractos más idóneos. En seguida se realizaron mediciones de viabilidad con tinciones de cristal violeta, para después confirmarlos con rojo neutro.

e Tinción con Cristal Violeta

Se retiró el medio de cultivo con tratamiento cada la microplaca y se hizo un lavado de los pocillos con 50 μ L de PBS. Se desechó el PBS y se fijó las células con PFA al 2%. En seguida, se hizo otro lavó con PBS para eliminar el PFA. Después se agregaron 100 μ L de cristal violeta a cada pocillo. Se incubó la microplaca por 30 min. Transcurrido este tiempo, se lavó la placa dos veces con PBS para eliminar restos de colorante. Por último se eluyó el colorante con 100 μ L de ácido acético al 10% y se leyó la placa a una absorbancia de 570 nm. Los cálculos se realizaron tomando como referencia el control contra los tratamientos.

f Tinción con Rojo Neutro

Se preparó una solución stock de Rojo Neutro a una concentración de 1 mg/mL con PBS. A partir de esta solución se tomaron 50 μ g/mL (50 μ g solución stock + 950 μ L de DMEM + SFB), se centrifugaron a 1,800 rpm durante 10 min y se sonicaron por 5 min (solución de trabajo). Se retiró el medio de cultivo de las microplacas con sus respectivos tratamientos y se lavaron dos veces con 100 μ L de PBS. Se agregaron 100 μ L de solución de trabajo a cada pozo. Se incubó por 2 h a 37 °C. Se retiró el medio de tinción de los cultivos y se eluyó el colorante con 100 μ L de EtOH al 50% + AAc al 2%. Se incubó la microplaca por 10 min y se leyó en espectrofotómetro a 540 nm.

g Tinción con Eosina-Hematoxilina

La tinción con Eosina-Hematoxilina se realizó para observar cambios morfológicos entre las células control y las expuestas a alguna fracción aislada de frutos de *Rubus*. Se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con agua destilada.

Se aplicó una gota de hematoxilina y se dejó reaccionar por 3 min y se lavó el exceso con agua corriente 3 veces. Se agregó agua amoniacal al 1% y se desechó. Se realizó un posterior lavado con agua corriente y se agregó una gota de eosina para dejarla por 1 min. Se realizaron lavados hasta eliminar el colorante. Por último, se agregó una gota de gelatina glicerinada caliente a cada pozo para fijar las células. Se procedió a tomar fotos al microscopio de las células teñidas.

11 Determinación de Daño Oxidativo

a. Ensayo de Lipoperoxidación

Para evaluar el daño oxidativo se empleó la metodología propuesta por Colín-González y col. (2015), donde la formación de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBA) fue utilizada como indicador para determinar los niveles de peroxidación de lípidos. Alícuotas de 50 μ L de cultivo celular homogenizado fueron adicionadas a 100 μ L del reactivo TBA (0.75 g de TBA + 15 g de ATC + 2.54 mL de HCl) e incubado a 100 °C por 40 min o hasta observar coloraciones rosa pálido en las muestras. Enseguida las muestras fueron puestas en hielo por 5 min y centrifugadas a 3,000 rpm por 15 min. La densidad óptica del sobrenadante fue medida en el espectrómetro Thermo Spectronic Genesys 8 a 532 nm. Los resultados fueron calculados como nmol de malonildialdehido (MDA) por mg de proteína y expresado como porcentaje de formación de SR-ATB contra su control.

b. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Para la determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizó la metodología descrita por Osseni y col., (1999). La formación de especies reactivas

de oxígeno intracelulares se determinó espectrofotométricamente usando la sonda fluorescente DCFH-DA, la cual se difunde fácilmente a través de la membrana celular y se hidroliza por esterasas intracelulares para formar el compuesto no fluorescente 2',7'-DCFH. Esta molécula se oxida rápidamente y forma 2',7'-DCFH-diacetato (DCFH-DA) que es una molécula altamente fluorescente en presencia de especies reactivas de oxígeno. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno intracelulares formadas. Las líneas celulares RG2 y C6 se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/mL en placas de 96 pozos por triplicado. Después de 10 y 45 h de incubación a 37 °C en CO₂ al 5%, las células fueron incubadas con 50 µL al 20 mM de DCFH-DA que se retiró a los 30 min. La intensidad de fluorescencia se determinó cada 30 min durante una incubación de 3 h utilizando el espectrofotómetro para placas de cultivo a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/530 nm.

c Determinación de Genotoxicidad

i Purificación de ADN Genómico

Para la purificación de ADN genómico se siguió el protocolo del Kit AxyPrep (Fisher Scientific, USA) para cultivos celulares, linfocitos, médula ósea y hueso. Se crecieron las células exponiéndolas a los extractos que presentaron mayor efecto citotóxico en placas de 24 pozos. Las células se despegaron con 150 µL del Buffer C-L y se mezclaron con 350 µL de PBS y se dejó la placa por 1 min a temperatura ambiente. Se homogenizó la muestra y se transfirieron los 500 µL a un tubo de 2 mL. Se agregaron 0.8 µL RNAasa A y 8 µL de la Proteinasa K. Se agitaron por 15 seg, se incubaron a 56 °C por 15 min y se centrifugaron por 1 min a 1500 rpm.

Posteriormente se agregaron 350 μ L del buffer P-D a la muestra y se agitaron 30 seg y se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Después, se realizaron lavados y elusión de las muestras colocando una columna Miniprep dentro de un tubo nuevo de 2 mL y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. Se descartó el filtrado de cada tubo y se colocó la columna de nuevo en el tubo. Se pipetea 500 μ L del buffer W1 en la columna y se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm. Se descartó el filtrado y se colocó la columna de nuevo en el tubo. Se agregaron 700 μ L del buffer W2 y se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 min, se descartó el filtrado del tubo y se repitió el lavado con otros 700 μ L del buffer W2. Se descartó el filtrado del tubo. Se colocó de nuevo la columna en el tubo y se centrifugó de nuevo a las condiciones mencionadas. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL para eluir el ADN genómico. Por último, se agregaron 100-200 μ L del eluyente hacia el centro de la membrana de la columna, se dejó por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm.

ii Electroforesis y Revelado de ADN

Para la electroforesis y revelado del ADN se utilizó el método de Elia y col., (1994). Se prepararon geles de agarosa al 1% y se cargaron con 10 μ L de muestra (previamente cuantificada bajo la proporción 260/280) y un marcador de corrida en la cámara electroforética con buffer TBE 0.5 X. Se programó la fuente de poder a 100 voltios y se corrió la electroforesis por 40 min. Se retiró el gel y se le llevó a cabo una tinción con bromuro de etidio (BE) para ver el revelado del ADN bajo luz UV en el fotodocumentador GelMax (UVP, Modelo 97-0672-01)

12 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis de medias se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con distintos factores y niveles acorde a la población experimental. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa Minitab 17. Los resultados se indican como valor promedio \pm desviación estándar. Los cálculos se hicieron con un valor de significancia de $p < 0.05$ bajo criterio de la prueba ANOVA. Las pruebas se realizaron por triplicado a menos que se indique un valor “ n ” diferente. Para los resultados de las pruebas de celulares se tomó como referente el control de cada ensayo para medir el efecto sobre los tratamientos.

VI RESULTADOS Y DISCUSIONES

A IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES

Las muestras botánicas colectadas en campo fueron examinadas en la sala Bletia del Herbario Nacional (HN) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo se realizó en conjunto con la Biol. Gilda Ortiz Calderón, especialista en la familia Rosaceae del HN. Después de un análisis comparativo se identificaron las siguientes especies:

1 *Rubus liebmannii*

Es una especie de mora nativa (probablemente endémica) de México. También es conocida como tunita de cerro, zarza y zarzamora en español y citunzarza y tsitubi en purépecha (CONABIO, 2010). Su distribución geográfica se reporta en varias zonas boscosas del país (**Figura 10**). Ecológicamente, como muchas especies de *Rubus*, son plantas importantes como colonizadoras de nuevos sitios para el desarrollo de otras especies asociadas de vegetación primaria (Rzedowski y Calderón-de Rzedowski, 1981). Algunas partes anatómicas (hojas, talos y frutos) de la esta planta se emplean en la medicina tradicional para diarrea, resfriado, disentería e insomnio (Aguilar-Contreras y col, 1994).

Focke (1874) describe a esta especie como plantas armadas con agujones; hojas compuestas, digitadamente 3-foliadas dispuestas cerca de las inflorescencias o 5-foliadas en el resto de las planta, serradas, coriáceas; tallos pilosos o puberulentos, sin tricomas glandulares; peciolo pilosos, los tricomas blancos o glabrescentes; estípulas no aplexicaules, lineares o lanceoladas: sépalos 5-12 mm,

con el ápice más corto que la lámina, cuspidado o caudado-acuminado; inflorescencias más abiertas, racemosas, con 5-20 flores; pedicelos 1-3 cm de diámetro; frutos pilosos o glabros: frutos 1-2.5 cm de diámetro; más de 30 drupeolas (**Figura 11**).

Tomando como referente a los criterios anteriores, podemos concluir que esta especie corresponde a *Rubus liebmannii*. Actualmente, la muestra biológica cuenta con el registró folio IBUNAM:MEXU:1417228 en el Herbario Nacional de dicha institución.

2 *Rubus palmeri*

Rydberg (1913) describió a esta especie como plantas armadas con aguijones; hojas compuestas, digitadamente 3-foliadas dispuestas cerca de las inflorescencias o 5-foliadas en el resto de la planta, serradas, coriáceas; tallos pilosos o puberulentos, sin tricomas glandulares; peciolo piloso, los tricomas pubescentes; estípulas no aplicauales, lineares o lanceoladas: sépalos 5-12 mm, con el ápice más corto que la lámina, cuspidado o caudado-acuminado; inflorescencias más abiertas, racemosas, con (5) 10-100 flores; pedicelos 1-3 cm de diámetro, glandulares; frutos pilosos o glabros: frutos 1-2.5 cm de diámetro; más de 30 drupelas (**Figura 12**); se considera una especie nativa del noroeste de México, con registros aislados en los estados de México; Chiapas, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz (**Figura 13**) y Guatemala; habitan en selvas caducifolias hasta bosques templados, de 1100-2000 msnm; crecen reclinadas sobre piedras, paredes u otras plantas (CONABIO, 2010). Se emplean frutos para

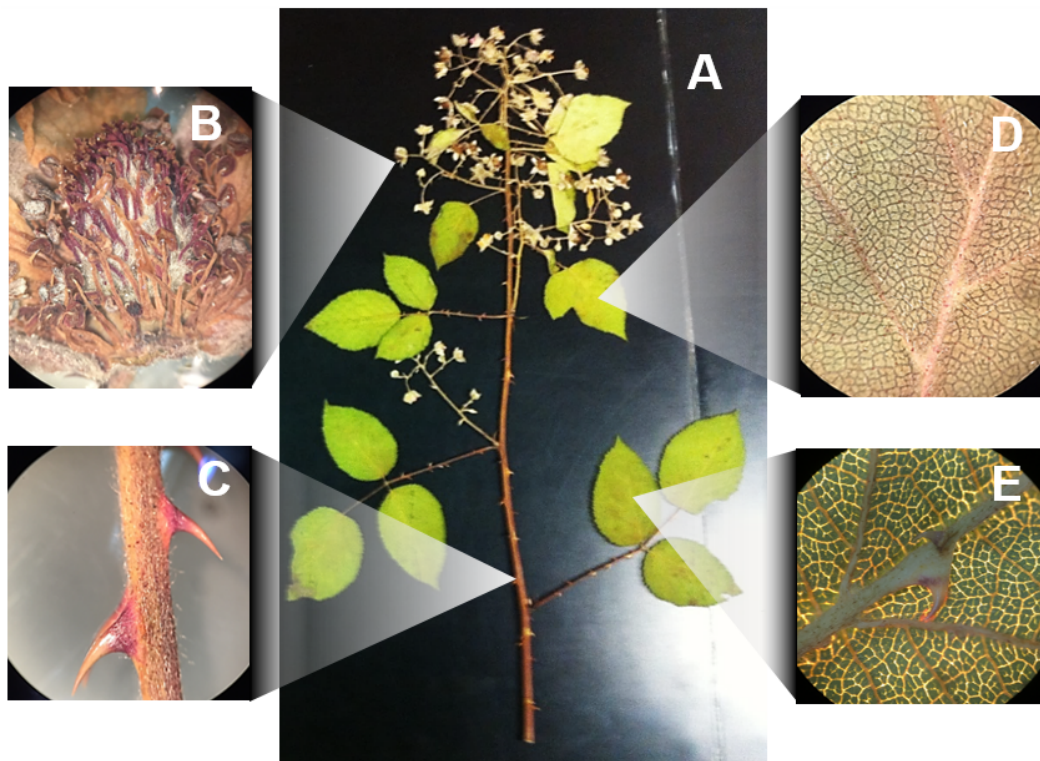


Figura 10. Muestras vegetales empleadas para la identificación de *R. liebmannii* **A.** Muestra colectada; micrografías de: **B.** Flor; **C.** Tallo y espinas; **D.** Haz de hoja; **E.** Envés de hoja.



Figura 11. Distribución geográfica de *Rubus liebmannii* en el territorio nacional (CONABIO, 2010).

la elaboración de mermeladas, tamales y dulces, además de hojas como medicamento para padecimientos parasitarios y dolores del sistema gastrointestinal (Rzedowski y Calderón-de Rzedowski, 2005). Bajo dichos criterios se concluyó que una de nuestras muestras poseía estas características y cuya presencia ya había sido reportada en el pasado para sitios aledaños a la zona de colecta por las expediciones Esquerri (1980), González-Ortega (1980) y Landrum, Li y Ying (1985). De esta manera nuestra muestra quedó a cargo del HN con el folio IBUNAM:MEXU:1417230, la cual además sirve como refrendo de la presencia de la especie en la región a través del tiempo desde su primer registro en 1980.

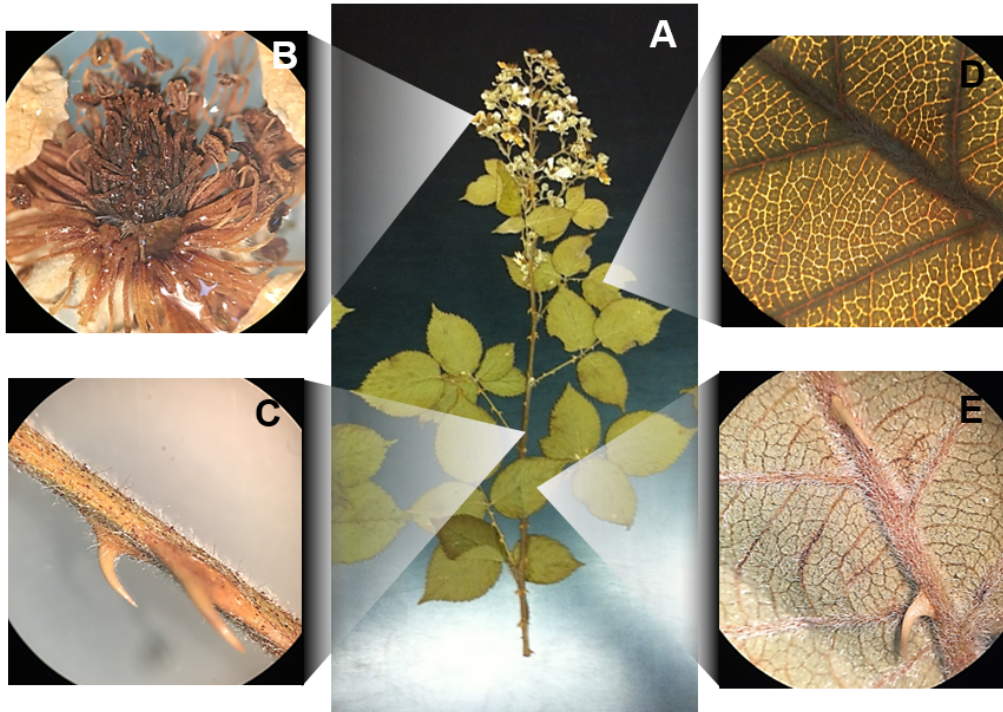


Figura 12. Muestras vegetales empleadas para la identificación de *Rubus palmeri*.
A. Muestra colectada; micrografías de: **B.** Flor; **C.** Tallo y espinas; **D.** Haz de hoja;
E. Envés de hoja.

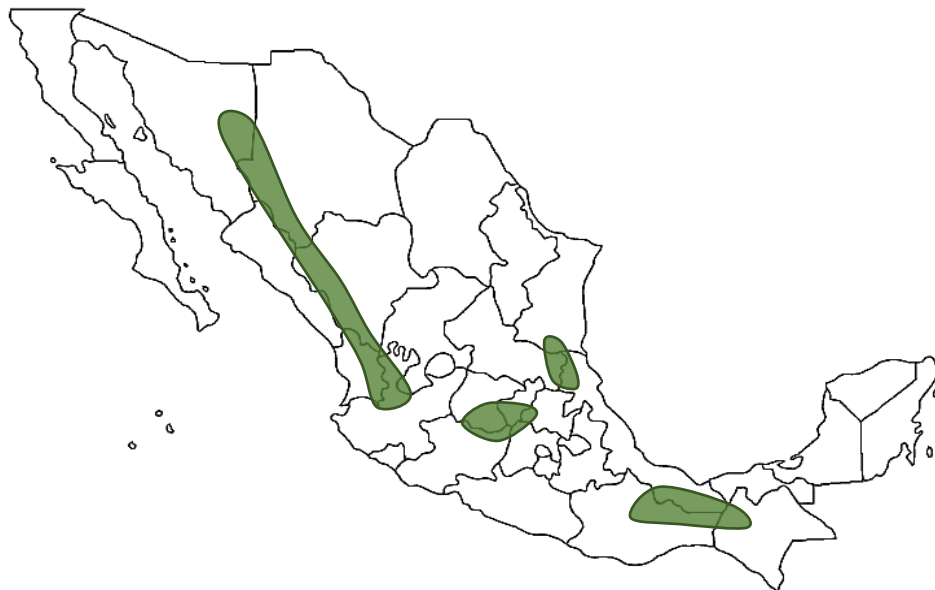


Figura 13. Distribución geográfica de *Rubus palmeri* (CONABIO, 2010).

3 *Rubus coriifolius*

Liebmann (1852) en su descripción original caracteriza a esta especie como plantas de tallos arqueados con espinas curvadas y muchos tricomas simples, sin glándulas pediculadas o cerdas; hojas penta y trifoliadas, folíolos elípticos u obovados, casi siempre irregularmente biserrados con dientes grandes y contiguos, con tricomas simples, densos y continuos en el envés; panícula con 10–50 flores, eje densamente piloso, glándulas pediculadas ausentes o pocas, cortas y desiguales, cerdas ausentes, acúleos en el eje y en los pedicelos ausentes o pocos; sépalos patentes cuando en fruto; pétalos 0.9–1.5 cm de largo, 1–2 veces el largo de los sépalos, blancos o rosados; fruto ovoide, mediano, negro, drupéolas pocas y grandes, glabras, cayendo junto con el receptáculo (**Figura 14**); tiene como sinónimo *Rubus floribundus*; éstas son plantas poco frecuente en bosques nublados, ampliamente distribuida desde el norte de Baja California hasta el sur de Chiapas (**Figura 15**), Centroamérica y Venezuela. Tallos, hojas y frutos se emplean en la herbolaria tradicional con propósitos antimicrobianos y antiparasitarios (Barbosa y col., 2006; Basurto-García, 2015).

Una de nuestras muestras colectadas en campo cumplía con dichos criterios taxonómicos, la cual quedó registrada en el HN como *Rubus coriifolius* bajo el folio IBUNAM:MEXU:1417229. Esta información es útil para ratificar la presencia de la especie en la zona desde su primer registro en 1969 e igualmente corroborada a través de otros trabajos de 1986, 1988-1991, 1998, y 1999 por diferentes colectores.

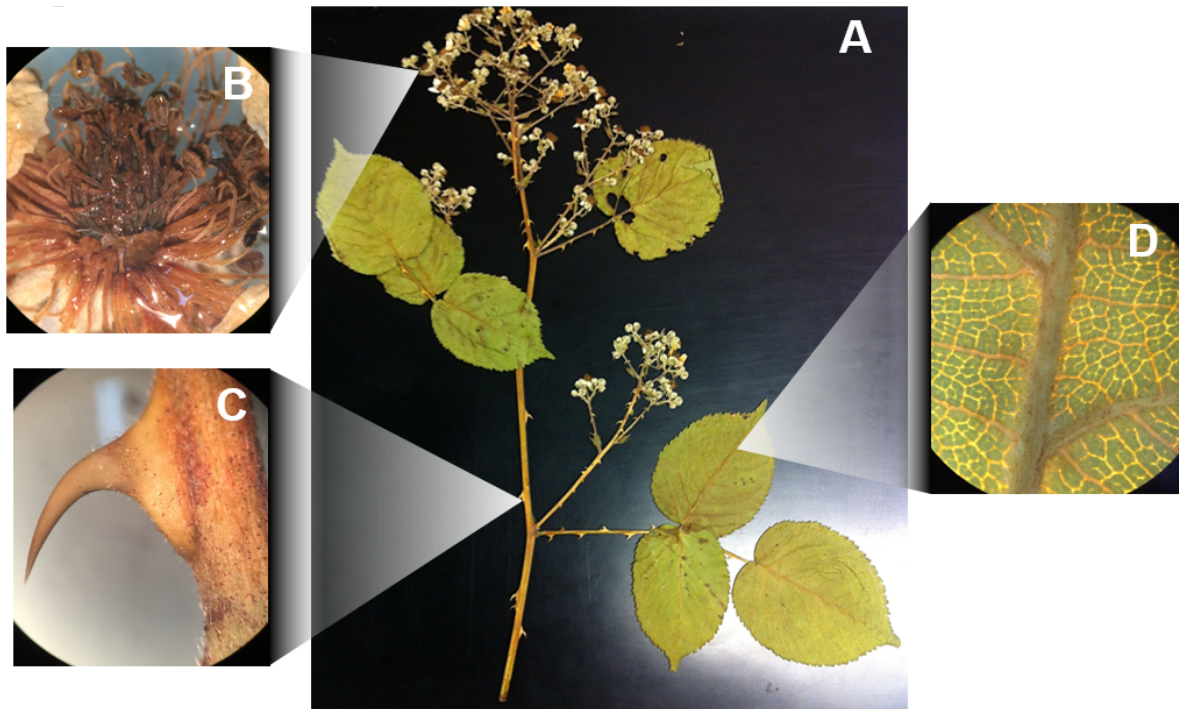


Figura 14. Muestras vegetales empleadas para la identificación de *Rubus palmeri*. A. Muestra colectada; micrografías de: B. Flor; C. Tallo y espinas; D. Haz de hoja; E. Envés de hoja.

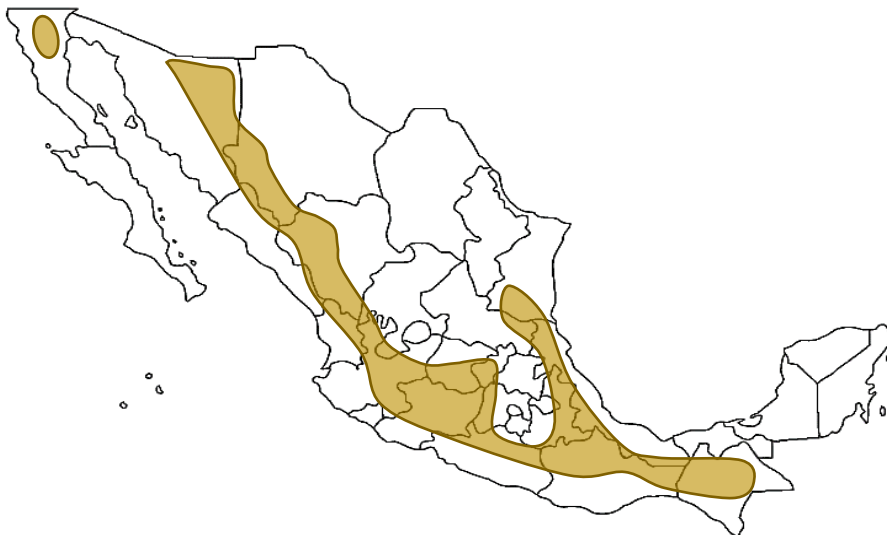


Figura 15. Distribución geográfica de *Rubus coriifolius* en el territorio nacional (CONABIO, 2010).

Cabe destacar que en total se colectaron exicados taxonómicos de tres especies de zarzamora para el ejercicio de clasificación biológica. Debido a que los habitantes locales consideraban la existencia de sólo dos especies de *Rubus* en la zona, no se colectaron frutos de *Rubus coriifolius* al ser confundida con *Rubus palmeri*.

B CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ESPECIES SILVESTRES DE *Rubus*

1 Composición química de frutos de *Rubus*

El **Cuadro 4** muestra la composición química de los frutos silvestres de *Rubus* recolectadas en Sinaloa. Ambos frutos tuvieron contenido de humedad alta, variando desde 89.3% (*Rubus liebmannii*) a 91.2% (*Rubus palmeri*). Ambas especies presentaron similar contenido de proteína de *Rubus liebmannii* (5.4 g/100 g bs) y *Rubus palmeri* (5.0 g/100 g de bs). Estos resultados concuerdan con los reportados para *Rubus* silvestres y *Rubus* cultivadas por diversos investigadores (Bushman y col., 2004; Acosta-Montoya y col., 2010; Caidan y col., 2014; Cuevas-Rodríguez y col., 2014; Vencia-Sullca y Guevara-Pérez 2013).

Con respecto, al contenido de grasa cruda en fruto de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri* los valores obtenidos fueron de 6.4 y 7.2g/100 g bs, respectivamente. Estos frutos objeto de nuestro estudio recolectados en el estado de Sinaloa tuvieron valores superiores para aquellos reportados por diversos investigadores (Caidan y col., 2014; Valencia-Sullca y Guevara-Pérez 2013; Cuevas-Rodríguez y col., 2014) quienes obtuvieron valores de contenido de grasa cruda en rango (2.6 a 5.5 g /100 g bs) y (<1.0 a 4.9 g/100 g bs), para *Rubus* silvestres y cultivadas, respectivamente.

El contenido de cenizas de los frutos de *Rubus* (2.5 a 2.9 g/100 g bs) se muestra en el **Cuadro 4**, los valores se encuentran dentro del rango encontrados por Valencia-Sullca y Guevara-Pérez 2013; Cuevas-Rodríguez y col., 2014, para *Rubus* domesticadas (2.4 a 3.7 g/100 g bs).

Cuadro 4. Composición química de especies silvestres del género *Rubus* colectadas en El Palmito, Sinaloa.

Componente químico¹	Especies	
	<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>
<i>Proteínas</i>	5.4 ± 0.4^a	5.0 ± 0.5^a
<i>Lípidos</i>	6.4 ± 0.4^b	7.2 ± 0.5^a
<i>Cenizas</i>	2.5 ± 0.2^a	2.9 ± 0.1^a
<i>Carbohidratos</i>	80.3 ± 0.7^a	80.3 ± 0.6^a

¹Los resultados se muestran en g/100 g de base seca (bs). Letras diferentes en el mismo renglón, indican valores significativamente diferentes a ($p < 0.05$) acorde a la prueba de Tukey.

El contenido de carbohidratos totales de los frutos bajo estudio, presentan valores similares (80.3 g/100g bs) para *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*. Nuestros valores se encuentran dentro de los límites reportados (81.0 a 85.0 g/100g bs) para *Rubus silvestres* por Cuevas-Rodríguez y col., 2014.

2 Perfil de minerales

El perfil de minerales de los frutos de las especies *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri* son mostrados en el **Cuadro 5**, se puede observar que los minerales presente en los materiales objetos de estudio se encuentran con diferente proporción, bajo el siguiente comportamiento orden decreciente: $K^+ > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$, similar comportamiento para ambas genero de *Rubus*.

Diversos investigadores han sugerido que presencia de minerales en frutos interviene de manera transcendental en los procesos metabólicos que le manifiestas propiedades estéticas, nutricionales y funcionales a los mismos. Con respecto al K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} estos minerales se correlacionan positivamente con la capacidad de mantener un pH estable en condiciones de acidez, metabolismo y concentración de carbohidratos, fotosíntesis, activación de enzimas y contenido de sólidos solubles en el fruto (Malavolta y col., 1997; Hawkesford y col., 2002; Sudheer e Indira, 2007; Kader, 2008); asimismo, Mg^{2+} es altamente significativo durante la fotosíntesis y queda como remanente considerable de este proceso al darse la madurez del fruto y bajar su tasa fotosintética (Santos-Guedes y col., 2013).

Cuadro 5: Concentración de minerales presentes en frutos de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*.

Minerales¹	Especies	
	<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>
Calcio (Ca²⁺)	1889.3	2051.2
Cobre (Cu²⁺)	6.6	8.0
Hierro (Fe³⁺)	44.3	41.7
Potasio (K⁺)	5928.1	4800.4
Magnesio (Mg²⁺)	1046.1	1654.3
Manganeso (Mn²⁺)	106.6	72.8
Sodio (Na⁺)	613.6	838.3
Zinc (Zn²⁺)	17.9	23.6

¹ ppm: partes por millón

En los que respecta a otros minerales, Cu^{2+} es el primordial en la composición de la membrana celular de los frutos, manteniendo la integridad y estabilidad de las paredes celulares, razón que se relaciona con la firmeza de frutos maduros, además participa de manera significativa en síntesis de clorofila y activador de la tasa fotosintética y de respiración celular (Malavolta y col., 2002); mientras que Mn^{2+} , es necesario en procesos de óxido-reducción, asimilación de carbono y el fotosistema I (Malavolta y col., 2002); finalmente Fe^{3+} está involucrado en la formación de precursores de clorofila y la activación de enzimas del metabolismo de carbohidratos (Malavolta y col., 2002).

3 Identificación y cuantificación de la fracción no polar (FNP)

El Análisis de GC-MS se utilizó para la identificación y cuantificación del perfil de ácidos grasos y otros compuestos no polares que se encuentran presentes en la fracción no polar (FNP) de frutos del genero *Rubus* colectadas en el estado de Sinaloa (**Cuadro 6**). Para ambos frutos de zarzamora colectadas en el estado de Sinaloa, podemos observar ácidos oleico (25.6 y 30.7%) y linolénico (28.0 y 30.2%) en *Rubus liebmannii* y *palmeri*, respectivamente, tuvieron los mayores porcentajes relativos con respecto al perfil de ácidos grasos totales. Los valores de porcentajes relativos de ácido oleico y linolénico de los materiales silvestres objeto de nuestro estudio se encuentran en rango de valores observados en zarzamoras silvestres y domesticadas por diversos investigadores (Fazio y col., 2013; Caidan y col., 2014).

Cuadro 6. Caracterización de la fracción no polar (FNP) de *R. liebmannii* y *R. palmeri*.

Componentes	TR¹	Compuestos Lipofílicos (%)	
		<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>
Ácido Palmítico (16:0)	30.6	10.3 ± 0.4^b	15.2 ± 0.3^a
Ácido Esteárico (18:0)	41.1	0.9 ± 0.1^a	0.6 ± 0.0^b
Ácido Oleico (18:1)	39.0	25.6 ± 1.2^b	30.7 ± 1.5^a
Ácido Linoleico (18:2)	39.8	15.1 ± 1.4^a	6.3 ± 0.8^b
Ácido Linolénico (18:3)	38.9	28.0 ± 0.1^b	30.2 ± 0.1^a
α-Tocoferol	52.6	12.5 ± 1.1^a	9.0 ± 1.8^b
β-Sitosterol	53.9	6.5 ± 0.5^b	8.0 ± 0.3^a

¹TR: Tiempo de Retención (min). Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa entre el mismo compuesto de diferentes especies con una (p<0.05) según prueba de Tukey.

Además de ácidos grasos en FNP, se identificó α -tocoferol, con contenidos de 12.5 y 9.0 % para *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*, respectivamente (**Cuadro 6**). Estos valores encontrados de las especies estudiadas en la presente investigación contienen contenido de α -tocoferol hasta 6 y 50 veces mayores que las reportadas para *Rubus* silvestres y domesticadas (Bushman y col., 2004; Fazio y col., 2013; Radočaj y col., 2014). Asimismo los frutos de *Rubus* contienen β -sitosterol (**Cuadro 6**): en *Rubus liebmannii* (8.0%) y *Rubus palmeri* (6.5%). Estos valores son superiores a las reportadas por Radočaj y col., 2014), para *Rubus* cultivadas (0.4 a 0.7%).

4 Identificación y cuantificación de la fracción de carbohidratos (FCHO)

El **Cuadro 7** muestra la identificación y cuantificación de carbohidratos de las dos especies de zarzamora silvestres (*R. liebmannii* y *R. palmeri*). Ambas especies se sometieron a un proceso de derivatización de carbohidratos (con el fin de mejorar la volatilidad y detección de las moléculas) con una posterior caracterización por cromatografía de gases. Los valores obtenidos indican que fructosa en ambas especies con 48.7% en *R. liebmannii* y 49.7% en *R. palmeri*. Los resultados obtenidos en este carbohidrato son similares a los reportados por (Escuredo y col., 2011), quienes observaron valores promedio de fructosa en de *Rubus* silvestres (37.4%), mientras para 52 genotipos de *Rubus* domesticados de Norteamérica se han observado niveles de fructosa de 41.5 al 52.0% (Fan-Guiang y col., 2010).

Cuadro 7. Caracterización y contenido de carbohidratos de *R. liebmannii* y *R. palmeri*.

Componentes	TR¹	Carbohidratos (%)	
		<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>
<i>Fructosa</i>	30.31	48.7 ± 0.5^b	49.7 ± 0.5^a
<i>Altrosa</i>	31.74	7.2 ± 1.7	6.8 ± 0.4
<i>Galactosa</i>	34.40	18.0 ± 0.6	17.8 ± 1.0
<i>Xilosa</i>	34.51	6.7 ± 0.9^a	5.5 ± 0.4^b
<i>Glucosa</i>	39.96	19.8 ± 0.7	21.0 ± 0.7

¹TR: Tiempo de Retención (min). Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa entre el mismo compuesto de diferentes especies con una (p<0.05) según prueba de Tukey.

En el **Cuadro 7** también se muestra el porcentaje relativo de altrosa y galactosa, las cuales son hexosas poco frecuentes en alimentos de origen vegetal, debido a que son carbohidratos producidos principalmente por heterótrofos como productos intermedios del metabolismo: Altrosa es sintetizada por *Butyrivibrio fibrisolvens*; o como productos finales como la galactosa producida por las glándulas mamarias de los mamíferos placentarios (Sunehag y col., 2002). El contenido de altrosa y galactosa en *Rubus liebmannii* y *palmeri* de las FCHO varió de 6.8 a 7.2%, y 17.8 a 18.0%, respectivamente.

Otros carbohidrato identificado en la FCHO, es la xilosa, con porcentaje relativo de 6.7 y 5.5% para *Rubus liebmannii* y *Rubus plameri*, respectivamente. Esta es una hexosa sustancial de la madera y de alimentos fibrosos de origen vegetal. La aparición de este monosacárido en la FCHO podría deberse a la modificación de su forma isomérica (xilulosa) presente en el receptáculo frutal al que se encuentran todas las drupelas de zarzamora (Martín-del Campo y col., 2013) o posible modificación de azúcares conjugados liberados de algunas antocianinas, debido a que agliconas como cianidina-3-xilósido y la delphinidina-3-xilósido han sido determinadas en otras especies de *Rubus* (**Cuadro 2**). Asimismo, porcentaje relativo de glucosa se estimó en 19.8% para *Rubus liebmannii* y 21.0% para *Rubus palmeri*. Algunos investigadores (Fang-Giang y Wrolstad, 2010) obtuvieron valores desde 38.9 a 52.6% en especies domesticadas, estas son variedades que destacan por su sabor dulce y gran tamaño con respecto a otros *Rubus*.

5 Contenido de polifenoles totales

El contenido de compuestos fenólicos totales de las distintas fracciones de las especies silvestres colectadas en la region noroeste de México se muestran en el **Cuadro 8**. En el fruto de zarzamoras silvestres se observa una concentración de 15.2 y 17. 3 mg EAG/g bs para *Rubus liebmanni* y *palmeri*, respectivamente. En diferentes estudios con frutos silvestres (Acosta-Montoya y col., 2010; Cuevas-Rodríguez y col., 2014) se reporta contenido fenólicos totales de 18.4 a 35.0 mg EAG/ g bs, observándose que nuestras especies silvestres contienen valores mas bajos que los reportados por dichos investigadores. Sin embargo, nuestros valores de contenido fenólicos totales dentro del rango reportado (14.2 a 22.4 mg EAG/g bs) para frutos de especies domesticadas por diversos investigadores (Dai y col., 2007; Valencia-Sullca y Guevara-Pérez, 2010; Cuevas-Rodríguez y col., 2014).

En lo que respecta a las fracciones ricas en polifenoles (FP), las cuales se obtuvieron después de pasar los extractos por la resina Amberlite XAD-7 (esta resina remueve: carbohidratos, ácidos fenólicos y minerales) (Cuevas-Rodríguez y col, 2010), estas fracciones (FP) mostraron valores de contenido fenólicos totales de 201.0 y 184.4 mg EAG/ g bs, en ambas especies de *Rubus* colectadas en el Estado de Sinaloa, respectivamente. El procedimiento de semipurificación a través de la resina Amberlite incremento el contenido de fenolicos totales 13.4 y 10.8 veces para *R. liebmannii* y *R. palmeri*, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cuevas-Rodríguez y col. (2010) en donde en frutos silvestres colectados en Michoacán, México, reportan valores de contenidos fenólicos totales que varían desde 92.7 a 187.2 mg EAG/g bs.

Cuadro 8. Contenido de compuestos fenólicos totales en el fruto y fracciones de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*.

Fracción	Fenólicos Totales (mg EAG/g bs)	
	<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>
Fruto	15.2 ± 0.6^b	17.3 ± 0.7^a
FPA		
FP	201.0 ± 6.9^a	184.4 ± 13.1^b
FPS		
FRA 1	474.7 ± 13.4^b	517.2 ± 28.2^a
FRA 2	319.9 ± 21.5^d	311.3 ± 14.9^d
FRA 3	209.0 ± 5.2^e	309.2 ± 47.1^d
FRA 4	140.5 ± 29.1^f	431.2 ± 10.2^c
FRA 5	460.5 ± 36.2^{abc}	476.8 ± 46.3^{abc}
FRP 1	292.4 ± 34.4^e	434.9 ± 27.4^{cd}
FRP 2	713.1 ± 58.1^a	637.5 ± 31.9^b

FPA: Fracciones Post Resina Amberlite; FPS: Fracciones Post Resina Sephadex; FP: Fracción Rica en Polifenoles; FRA: Fracción de Antocianinas; FRP: Fracción de Proantocianidinas; EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; bs: base seca. * Diferencia significativa dentro del mismo renglón con un valor de significancia de ($p < 0.05$ con prueba estadística de Tukey; letras diferentes indican diferencia significativa entre celdas, a una $P < 0.05$ de significancia con prueba estadística de Tukey.

Posteriormente, a la semipurificación con la resina Amberlite XAD-7, la fracción ricas en polifenoles (FP) se colocaron en una columna empacada con la resina Sephadex LH-20, la cual se emplea para separar compuestos fenólicos empleando distintos solventes, generando hasta 5 fracciones ricas en antocianinas (FRA) y 2 fracciones ricas en proantocianidinas (FRP) en ambas especies silvestres colectadas en Sinaloa, México (**Cuadro 8**). En las fracciones ricas en antocianinas (FRA), el contenido de fenólicos totales en *Rubus liebmannii* y *palmeri* varió de 140.5 a 474.7.4 y de 309.2 a 517.2 mg EAG/g bs, respectivamente. En dichos resultados se logra apreciar que las FRA 1 lograron obtener los mayores valores de estos compuestos en ambas especies (**Cuadro 8**). De igual manera se observa que los valores obtenidos mas bajos de los compuestos fenólicos se presentaron para las FRA 4 en *Rubus liebmannii* y FRA 3 en *Rubus palmeri*. Estos valores concuerdan con lo reportado por diferentes investigadores que utilizaron la separación de polifenoles bajo el mismo procedimiento (Cuevas-Rodríguez y col., 2010), quienes informan contenidos de fenólicos totales en zarzamoras silvestres y cultivadas de 211.4 a 598.0 mg EAG/g bs y 221.5 a 526.3 mg EAG/g bs, respectivamente.

En las fracciones ricas en proantocianidinas (FRP), el contenido de fenólicos totales en *Rubus liebmannii* y *palmeri* varió de 292.4.5 a 713.1 y de 434.9 a 637.7 mg EAG/g bs, respectivamente. En dichos resultados se logra apreciar que las FRP 2 lograron obtener los mayores valores de estos compuestos en ambas especies (**Cuadro 8**). De igual manera se observa que los valores obtenidos mas bajos de los compuestos fenólicos se presentaron para las FRP 4 en ambos *Rubus*.

6 Identificación y cuantificación de las fracciones ricas en antocianinas (FRA)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) así como la espectrometría de masas (MS) fueron métodos utilizados para la identificación y confirmación de las antocianinas que se encuentran presentes en ambas especies de los frutos del género *Rubus* colectadas en el Noroeste de México en estudio (**Figura 16A, 16 B**).

De acuerdo a la **Figura 16 A** se identificaron 3 diferentes tipos de antocianinas en los frutos de *Rubus liebmannii*, donde el perfil de antocianinas mostró que son derivadas del aglicón cianidina; donde se observan de tipo glucosiladas: cianidina-3-O-glucósido (Cy-3-Glu) y cianidina-3-O-rutinósido (Gy-3-Rut), y de manera acilada cianidina-3-O-(6-malonil)-glucósido (Cy-3,6-Mal-Glu). Estos resultados son consistentes en las evaluaciones analíticas (HPLC, LC-ESI-MS, MS/MS) debido a que las antocianinas tuvieron tiempos retención en HPLC concordantes con los de un control caracterizado previamente bajo las mismas condiciones experimentales (Cuevas-Rodríguez y col., 2010). Las evaluaciones realizadas a través por LC-ESI-MS mostraron tiempos de retención diferentes a los observados en los cromatogramas de HPLC (**Figura 16B**), esto es debido a la utilización de una columna cromatográfica y gradiente diferentes. Sin embargo, esto permitió una separación más eficientemente en estos compuestos y una mejor detección a través de MS.

La confirmación de las antocianinas identificadas en presente estudio se llevó a cabo con la comparación de los tiempos de retención y la confirmación del peso molecular (**Figura 17**). Las antocianinas presentes en frutos de *Rubus liebmannii*,

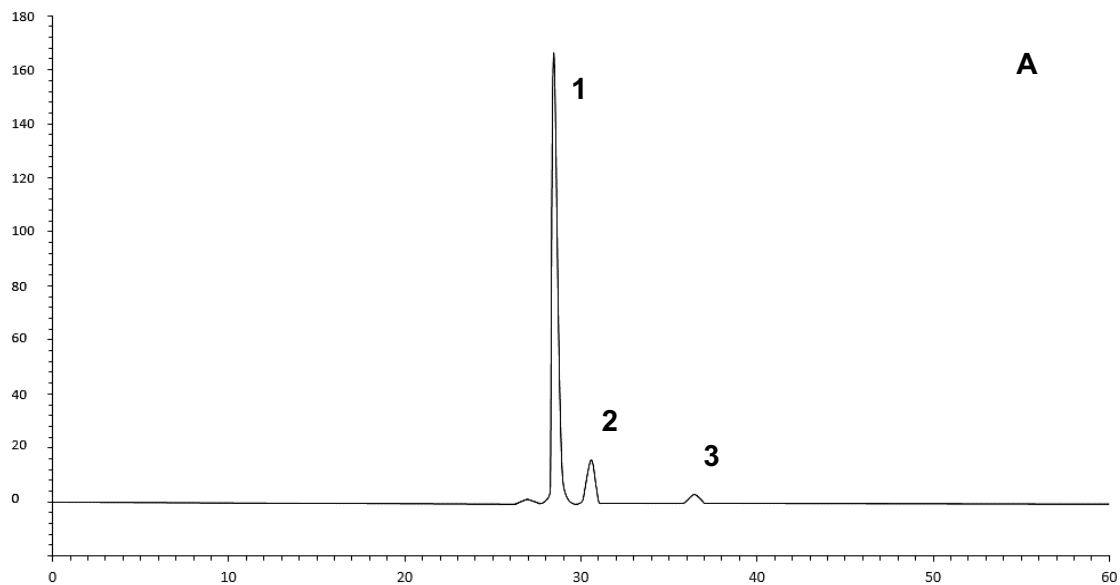
fueron caracterizadas por fragmentación mediante MS/MS. Esta técnica muestra dos iones: un ión cuasi molecular $[M+H]^+$ y un ión fragmento $[M+H-X]^+$ derivado de la pérdida del sacárido. Sin embargo, debido a que las antocianinas tienen una carga positiva natural, se observa el ion molecular $[M]^+$ y un ión fragmento $[M-X]^+$.

El análisis de MS/MS de este estudio indica la presencia de un ión $m/z = 287$, este ión está asociado a la aglicona de *cianidina* (Giusti y col., 1999; Lee y col., 2012). Asimismo, de acuerdo a los espectros obtenidos de MS/MS se observó la presencia de un ión a $m/z = 449$ y un fragmento de $m/z = 287$, los cuales están relacionados con *cianidina-3-glucósido* (Cy-3-Glu). Además, otros iones de $m/z = 595$ y 535 y fragmentos de $m/z = 287$ obtenidos están relacionados con *cianidina-3-rutinósido* (Cy-3-rut) y *cianidina-3-(6-malonil)-glucósido* (Cy-3-6-Mal-Glu).

En lo que respecta, en frutos de zarzamora silvestres *Rubus palmeri*. Adicionalmente, para las antocianinas identificadas en *Rubus liebmanni* (Cy-3-glu, Cy-3-rut y Cy-3-6-Mal-Glu), se observó *cianidina-3-O-xilosilrutinósido* (Cy-3-Xyl-Rut), (**Figura 18A**). En el cromatograma de LC-MS de *Rubus palmeri* el orden de elusión de las antocianinas es diferente al observado en HPLC (**Figura 18B**). Mediante MS/MS la fragmentación indica una relación m/z de 287 constante en las muestras, al igual que en *Rubus palmeri*, por tanto las antocianinas presentes también son derivados de *cianidina* (**Figura 19**).

Las antocianinas presentes en frutos de *Rubus palmeri* mostraron una fragmentación similar al de las antocianinas observadas en *Rubus liebmanni* Cy-3-glu $m/z = 449, 287$; Cy-3-Rut $m/z = 595, 509, 469, 331, 287$; Cy-3-6-Mal-Glu $m/z = 535, 287$ mas la correspondiente a Cy-3-Xyl-Rut $m/z = 727, 641, 609, 581, 463,$

287, antocianinas que sido reportado en genero *Rubus* (Ku y Mun, 2008; Tulio y col., 2008; Estupinan y col., 2011; Kim y col., 2011).



AntoMoraMuestra1_160216121104

2/16/2016 12:11:04 PM

RT: 0.00 - 35.00

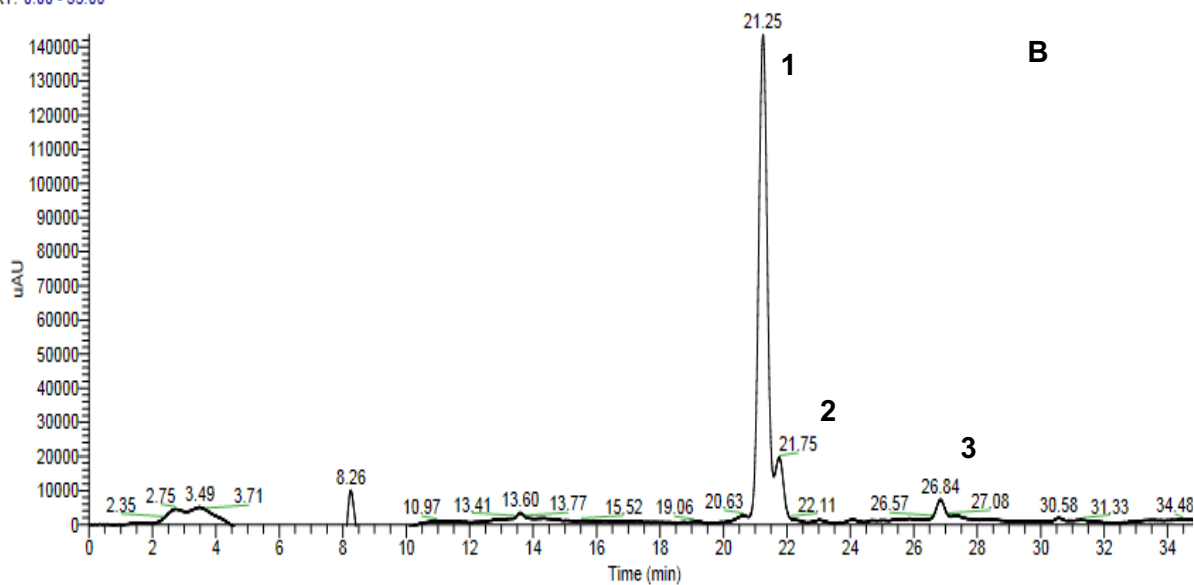


Figura 16. Cromatogramas de HPLC (A) y LC-ESI-MS (B) de antocianinas de frutos de *Rubus liebmannii*; **1:** Cianidina-3-O-glucósido (Cy-3-Glu); **2:** Cianidina-3-O-rutinósido (Cy-3-Rut); **3:** Cianidina-3-O-(6-malonil)-glucósido (Cy-3-6-Mal-Glu).

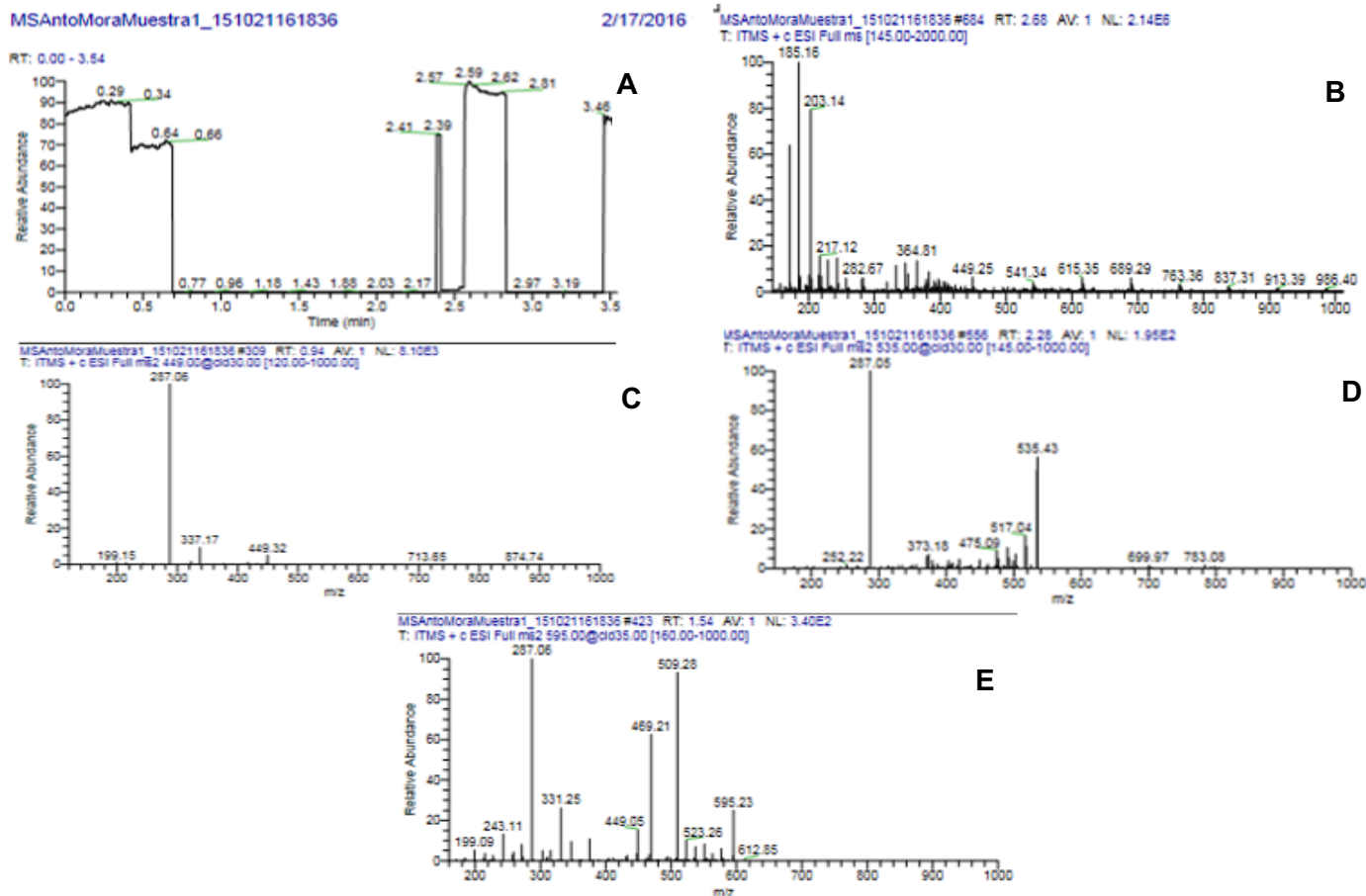
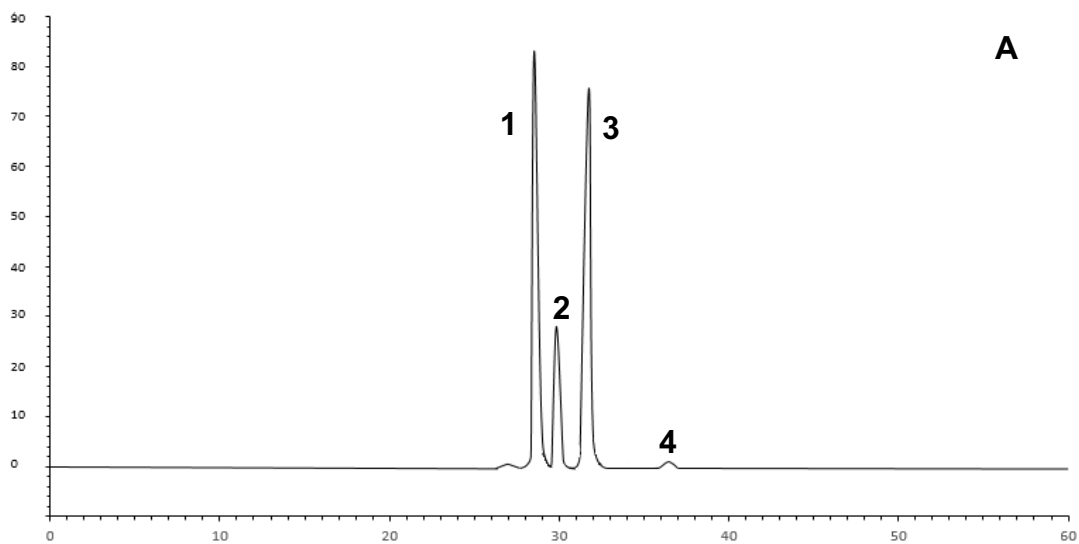


Figura 17: Fragmentación de antocianinas presentes en frutos de *Rubus liebmanni* de 145-1000 m/z: **A:** Abundancia relativa de fragmentos ionizados; **B:** Espectro completo de los iones presentes en la muestra; Fragmentación de: **C:** cianidina-3-glucósido; **D:** cianidina-3-(6-malonil)-glucósido; **E:** cianidina-3-rutinósido.



AntoZarzaMuestra2_160217123810

2/17/2016 12:38:10 PM

RT: 0.00 - 35.00

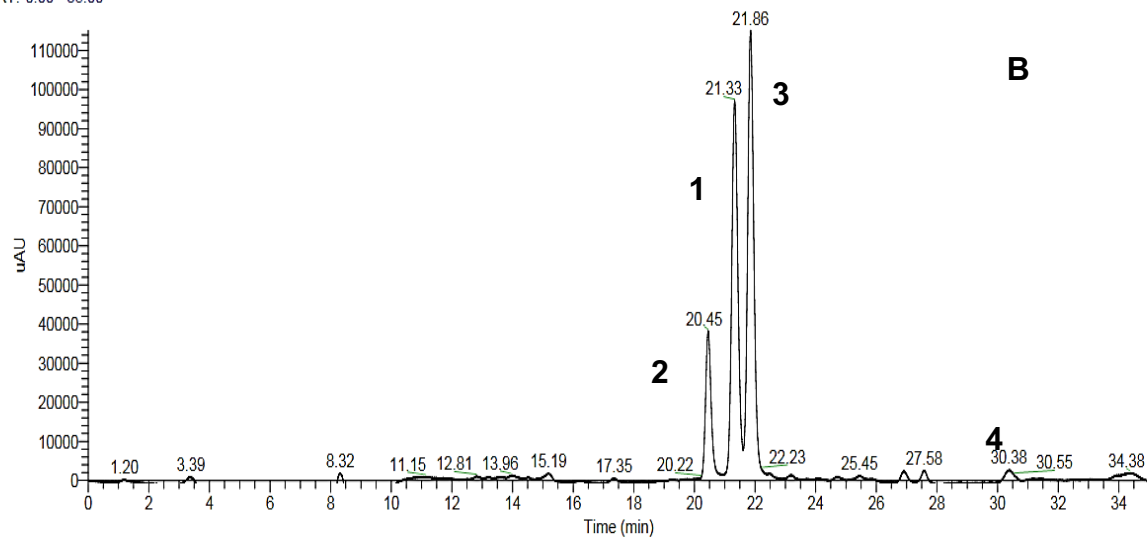


Figura 18. Cromatogramas de HPLC (A) y LC-ESI-MS (B) de antocianinas de frutos de *Rubus palmeri*; **1:** Cianidina-3-O-glucósido (Cy-3-Glu); **2:** Cianidina-3-O-rutinósido (Cy-3-Rut); **3:** Cianidina-3-O-(6-malonil)-glucósido (Cy-3-6-Mal-Glu); **4:** Cianidina-3-O-xilosilrutinósido (Cy-3-Xyl-Rut).

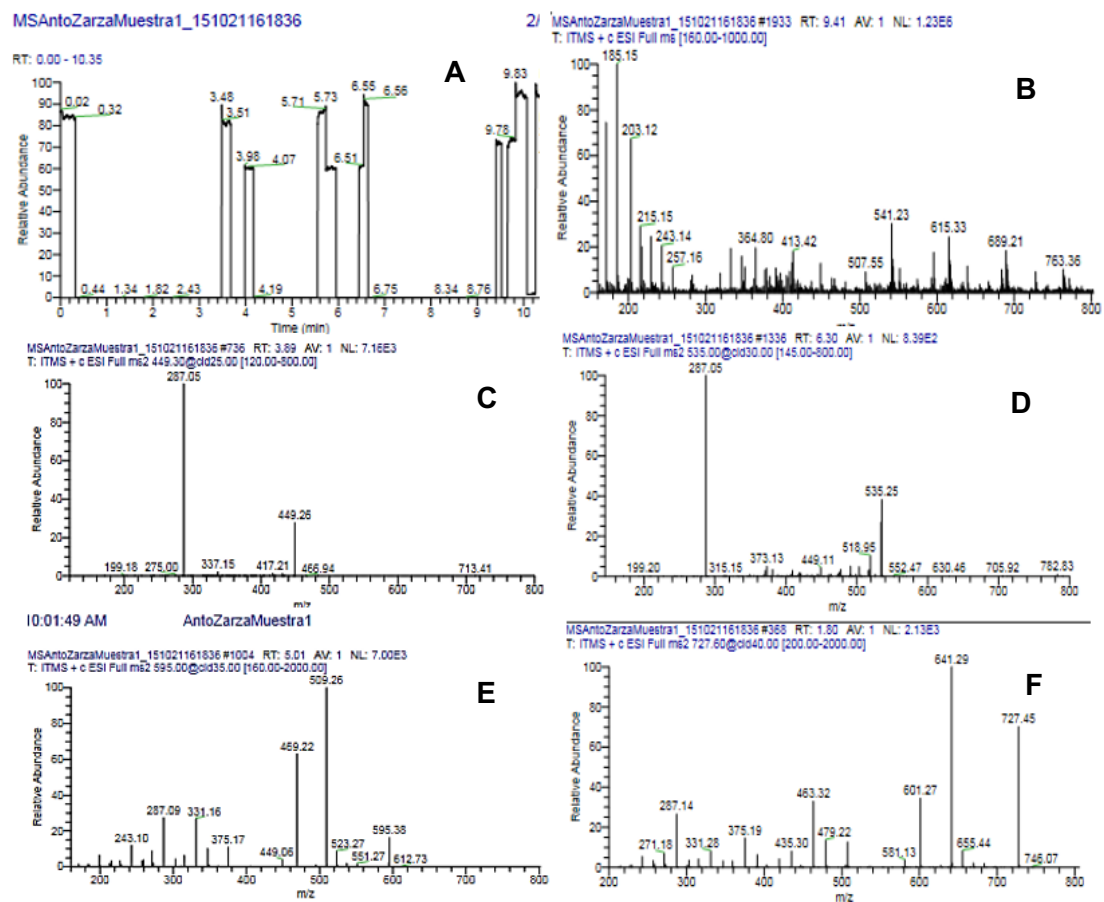


Figura 19: Fragmentación de antocianinas presentes en frutos de *Rubus liebmannii* de m/z 160-800: **A:** Abundancia relativa de fragmentos ionizados; **B:** Espectro completo de los iones presentes en la muestra. Fragmentación de: **C:** cianidina-3-glucósido; **D:** cianidina-3-(6-malonil)-glucósido; **E:** cianidina-3-rutinósido; **F:** cianidina-3-xilosilrutinosido

En el **Cuadro 9** se muestran el contenido y perfil de las antocianinas de las zarzamoras silvestres del genero *Rubus*. Acorde a estos resultados en *Rubus liebmannii* la antocianina predominante es Cy-3-Glu, seguida por Cy-3-Rut y Cy-3-6-Mal-Glu, con un 83.5, 11.3 y 5.2%, respectivamente. Mientras, en *Rubus palmeri* la antocianina mayoritaria es Cy-3-Rut, seguida por Cy-3-Glu, Cy-3-Xyl-Rut y Cy-3-6-Mal-Rut, con un 45, 38.3, 12.1 y 4.6%, de manera respectiva.

Cy-3-Glu es la antocianina reportada con mayor frecuencia en frutos de *Rubus* de todo el mundo, siendo esta también la más abundante con respecto a otras antocianinas (**Cuadro 3**). Sin embargo, interesantemente en *Rubus palmeri* la antocianina más abundante, correspondio a *Cy-3-Rut* que representó el 45% de antocianina total. Esta antocianina se reporta con frecuencia en frutos de *Rubus*, pero a pesar de ello, no supera el 30% del total de antocianinas en la mayoría de las especies. Las formas aciladas de cianidina son reportadas en frutos de *Rubus* en concentraciones bajas, estando entre los principales la cianidina-3-dioxalilglucósido y *Cy-3-6-Mal-Glu*, en presente estudio *Cy-3-6-Mal-Glu* se identifico en *Rubus liebmannii* y *palmeri* con porcentajes de 5.2 y 4.6% de antocianina total, respectivamente.

Cuadro 9. Porcentaje de antocianinas individuales presentes en frutos de ambas especies de *Rubus*

<i>n</i>	Antocianina	TR	AI ¹ (%)		Masa (m/z)	Fragmentos (m/z)
			<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>		
1	Cy-3-Glu	28.7	83.5	38.3	449	449, 287
2	Cy-3-Xyl-Rut	30.1	ND	12.1	727	727, 641, 609, 581, 463, 287
3	Cy-3-Rut	32.5	11.3	45.0	595	595, 509, 469, 331, 287
4	Cy-3-6-Mal-Glu	36.2	5.2	4.6	535	535, 287

¹ Porcentaje de antocianinas individuales acorde a los cromatogramas obtenidos por HPLC. Cy-3-Glu: Cianidina-3-O-glucósido; Cy-3-Xil-Rut: Cianidina-3-O-xilosilrutinósido; Cy-3-Rut: Cianidina-3-O-rutinósido; Cy-3-6-Mal-Glu: Cianidina-3-O-(6-malonil)-glucósido; m/z: relación carga/ion; TR: Tiempo de Retención (min); ND: No detectado.

7 Identificación y cuantificación de las fracciones ricas en proantocianidinas

Después de la purificación de las Fracciones de polifenoles (FP) utilizando la resina Sephadex LH-20 y solvente (acetona 70%), se lograron obtener fracciones ricas en proantocianidinas (FRP). Cuando estas fracciones (FRP) fueron analizadas a través de HPLC (absorbancia 280 nm) revelaron la presencia de taninos en concentraciones altas y patrón bajo de separación por este método y gradiente (**Figura 20**). Esta evaluación nos permitió confirmar la localización de proantocianidinas y taninos hidrolizables. Debido a que no se tienen estándares comerciales, HPLC no se logró identificar (HPLC) los componentes de las FRP. Razón por la cual se prosiguió a realizar análisis por MS/MS de dichas fracciones, para identificar estos compuestos químicos acorde a su patrón de fragmentación.

En lo que respecta, en *Rubus liebmannii* se detectó la presencia de taninos hidrolizables como condensados (**Figura 21 y 22**). Dentro de los taninos hidrolizables o elagitaninos se halló ácido elágico (m/z 301) y derivados de ácido dihidroxidifenol (HHDP), estructura básica de este grupo de taninos (Hager y col., 2008), compuesto químico que con frecuencia son asociados a derivados de galoil (galoil-bis-HHDP-glucopirano), llamado como casuarictina o potentilina y sus formas isoméricas (Hager y col., 2008). Algunas estructuras oligoméricas de elagitaninos presentes en *Rubus* son sangüína H-6 y su isómero la lambertianina A, que además han sido reportadas en concentraciones altas. Otros elagitaninos reportados son el dímero sangüína H-10 o lambertianina B; el trímero lambertianina C y el tetrámero lambertianina D (Gupta y col., 1982; Clifford y Scalbert, 2000; Mollen y col., 2003;

Bushman y col., 2004; Koponen y col., 2007; Acosta-Montoya y col., 2010; Cuevas-Rodríguez y col., 2011).

Dentro de los elagitaninos de *Rubus liebmannii* se encontró un perfil de la relación carga/ion (m/z) que nos sugiere la presencia de sangüina H-6/lambertianina A a una m/z de 1870 [M + H] y un patrón de fragmentación de m/z de 1567 (M -HHDP); m/z de 1236 (M - 332, -1 HHDP, -2 H₂O); m/z de 933 (M - 2HHDP, - 1 glucosil, - 1 galoil); m/z de 858 (M - 378, -1 glucosil, -1 galoil, -2 H₂O). Ambas, sangüina H-6 y lambertianina A son casi idénticas en su estructura. Sin embargo, sangüina H-6 presentan una pequeña variabilidad en la posición ecuatorial del grupo carbonilo de la molécula de ácido gálico de la hexosa de la casuarictina H-1'. Pedunculagina esta relacionada con m/z de 783 [M-1]. Razón que sugerimos la presencia de Lambertianina C al localizar la señal de m/z de 1401 (M - mitad del la molécula), cuya m/z es de 2805 [M-H]. Lambertianina D se detectó con una m/z de 1870 (M -.1/2 molécula + 1 HHDP), correspondiente a la mitad del peso molecular tetrámero original de casuarictina cuya m/z es de 3740.

En la **Figura 21** aparecen taninos condensado como (epi)catequina con el patrón de fragmentación de m/z (289). En las esta especie de *Rubus liebmannii* se descubrió la presencia de polímeros de casuarictina, con masa molecular (936.64 g/Mol) y detectada a m/z 935 [M - H]. Esta molécula puede derivarse polímeros de pedunculagina por la pérdida de un grupo galato (Kool y col., 2010). Ambos, taninos hidrolizables, como condensados, han sido reportados con frecuencia en distintos trabajos para diferentes especies de *Rubus* domesticadas y

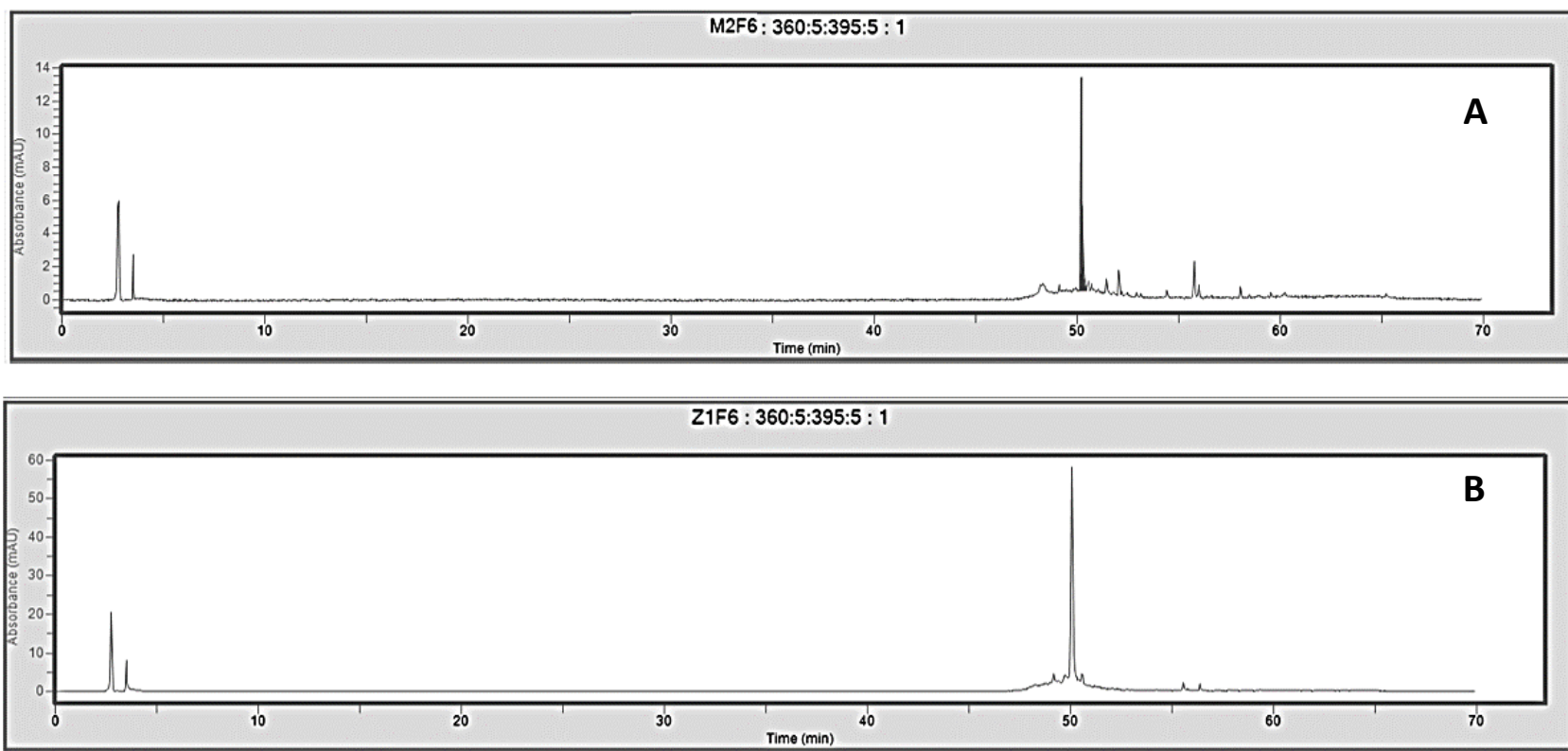
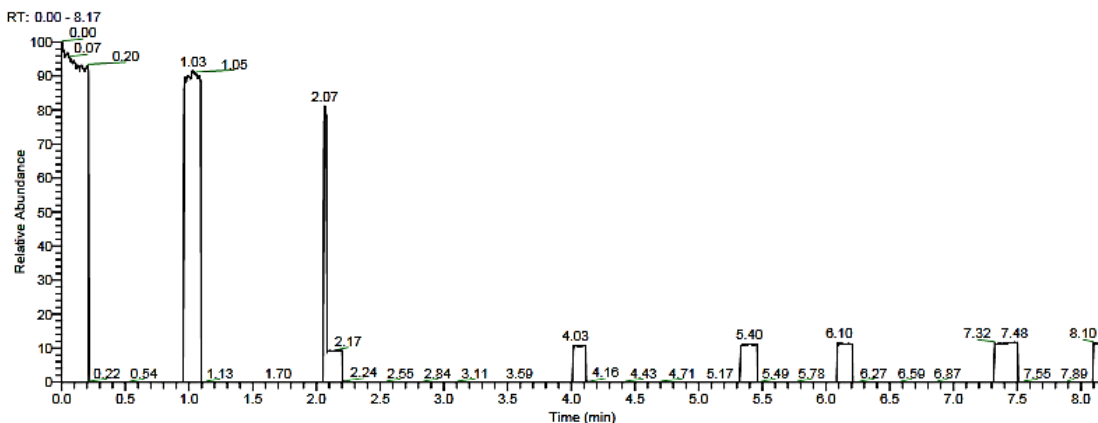


Figura 20: Cromatogramas obtenidos por HPLC. A: Cromatograma de la fracción rica en proantocianidinas (FRP) de *Rubus liebmannii*; B: Cromatograma se la FRP de *Rubus palmeri*

1

NL:
3.77E7
TIC MS
M2F6_1503
10155930



M2F6_150310155930 #1079 RT: 7.37 AV: 1 NL: 1.71E5
T: ITMS - c ESI Full ms [65.00-2000.00]

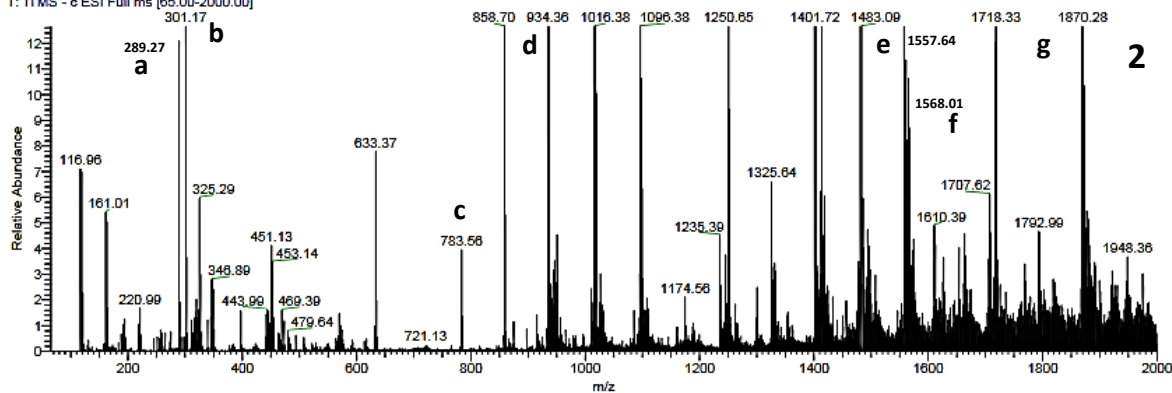


Figura 21. Espectro de masas (MS/MS) de la FRP de *Rubus liebmannii*. **1.** Intensidad de señales acorde al tiempo de corrida. **2.** Espectro de masas completo en ion positivo, m/z 100-2000; **a.** monómero de (epi)catequina; **b.** monómero de ácido elágico; **c.** monómero de pedunculagina; **d.** monómero de casuarictina; **e.** dímero de casuarictina; **f.** trímero de casuarictina; **g.** tetrámero de casuarictina.

silvestres (Acosta-Montoya y col., 2010; Cuevas-Rodríguez y col., 2010; Kool y col., 2010). En la **Figura 21** se observan taninos condensado como (epi)catequina con el patrón de fragmentación de m/z (289).

Mientras, en *Rubus palmeri* se detectó m/z que pueden sugerir la representación de elagitaninos (monómeros de ácido elágico) con la señal del ion 301 de m/z [M - H], asimismo, aparece constantemente en las muestras m/z (935), que podría a casuarictina (**Figura 22**). De manera tentativa, sugerimos la presencia de sangüiína H-2 con una relación m/z de 1104 [M + H] y un patrón de fragmentación de 1058 (M - 46; - 1 CO₂), m/z de 935 (M - 123; - 1 CO₂, - trihidroxibenzeno); m/z de 633 (M - 302; - 1 CO₂, - 1 galoil, -1 HHDP). Además, proponemos la localización de sangüiína H-6/lambertianina A bajo la m/z de 1567 [M - H] y un patrón de fragmentación de m/z de 1236 (M - 331; - 3 HHDP), m/z de 934 (M - 302; - 2 HHDP, - 1 glucosil, - 1 galoil). Existe una señal que sugiere la presencia de sangüiína H-10/Lambertianina B con la m/z 1567 [M-H], bajo el patrón de fragmentación de m/z 1236 (M - 331; -1 HHDP y -2 H₂O), m/z 917 (M - 319; - 1 galato, -1 glucosil), m/z 783 (M - 134; -1 galoil) m/z 633 (M - 150; -1 galoil), m/z 301 (M-332; 1-galoil, -1 glucosil). Un patrón similar de fragmentación de estos elagitaninos fue observado por Kool y col. (2010) para boysenberry (*Rubus loganbaccus x baileyanus*) Finalmente, sugerimos la posible localización de monómeros de pedunculagina debido a la detección del ion m/z 783 [M-H]. Lambertianina C puede asociarse a la m/z 1402 [M + H], pudiéndose fragmentar en la m/z de 1098 (M - 1 galoil), m/z de 1015

1

RT: 0.00 - 9.68

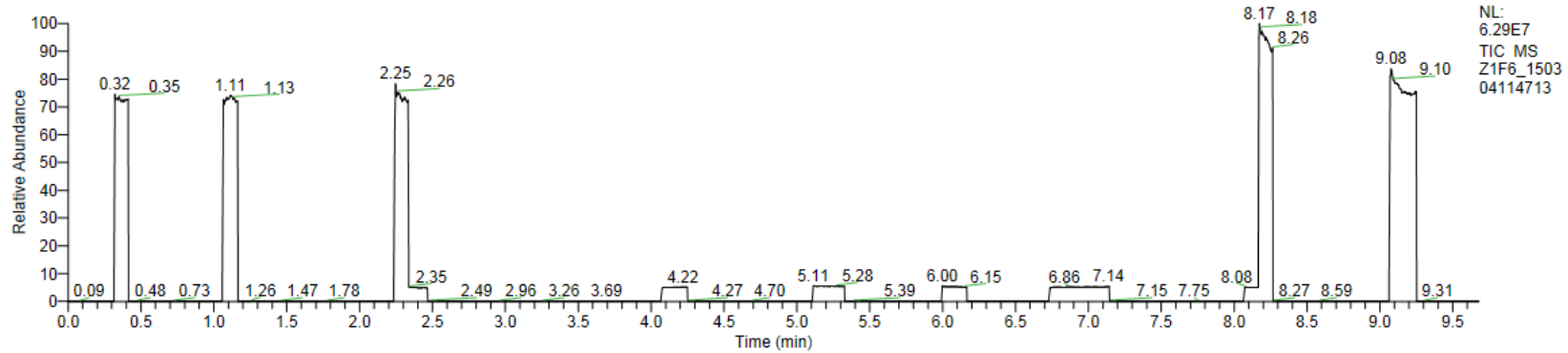
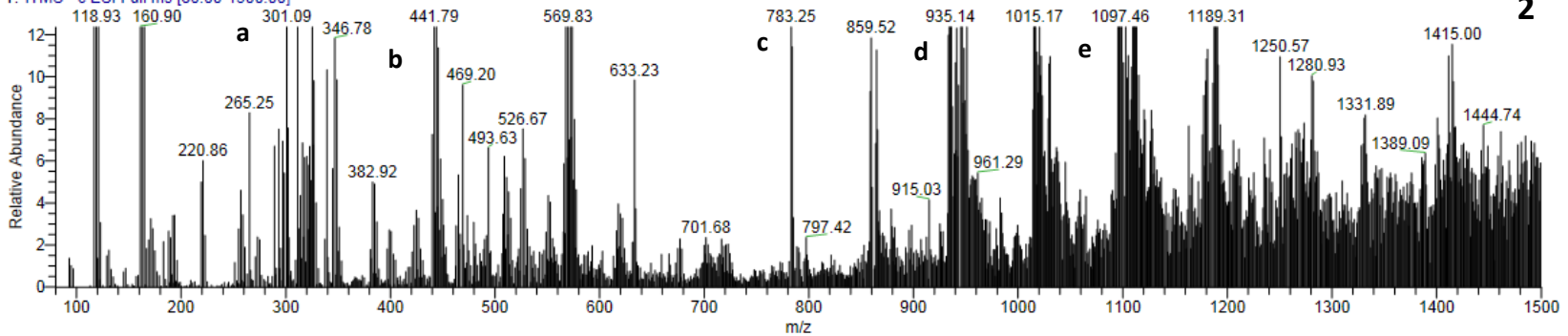
Z1F6_150304114713 #1079 RT: 6.04 AV: 1 NL: 6.69E4
T: ITMS - c ESI Full ms [80.00-1500.00]**2**

Figura 22. Espectro de masas (MS/MS) de la FRP de *Rubus palmeri*. **1.** Intensidad de señales acorde al tiempo del análisis. **2.** Espectro de masas completo en ion positivo, m/z 100-2000; **a.** monómero de ácido elágico; **b.** monómero de (epi)catequina galato; **c.** monómero de pedunculagina; **d.** monómero casuarictina; **e.** malabatrina A.

Mediante RMN ^1H de la FRP de *Rubus liebmannii* se obtuvo un espectro cuyas señales sugieren la presencia de una mezcla compleja de taninos hidrolizables (**Figura 23**). Basándonos en el patrón de fragmentación de los taninos que componen la FRP de *Rubus liebmannii* obtenidos por MS/MS (**Figura 21**) nos dispusimos a seguir el patrón de desplazamientos químicos arrojados por los protones de hidrógeno (^1H) haciendo una calibración previa del espectro para CDOD_3 (el cual se usó como solvente de la FRP). Mediante reportes previos realizados en distintos trabajos para detectar compuestos fenólicos en frutos de *Rubus* y otras rosáceas (Costa-Ayres y col., 2009; Kool y col., 2010; Vrhovsek y col., 2012; Paudel y col., 2013; Paudel y col., 2014; Oszmiański y col., 2015), logramos identificar las señales características que han sido descritas para taninos condensados ácido elágico (**Figura 23A**) y casuarictina (**Figura 23B**) y sus derivados. De igual manera se pudieron determinar indicios de la presencia de (epi)catequinas por este método (**Figura 23C**).

Un análisis subsecuente de la muestra por RMN ^{13}C (**Figura 24**) confirmó nuevamente la presencia de los taninos hidrolizables observados en las pruebas anteriores, estando aún ausente cierto tanino condensado. Sin embargo, esta evaluación permitir identificar compuestos acorde a las interacciones angulares de los C, así como variantes isoméricas entre moléculas que no pueden ser detectadas por HPLC (a menos que se emplee una columna quiral), MS y RMN ^1H . De esta manera pudimos determinar la presencia de epicatequina al proyectar señales aproximadamente a δ 6.5-6.9 ppm (**Figura 24C**), como la catequina establece señales cerca de los δ 3.8 ppm (Donovan y col., 1999). De igual manera

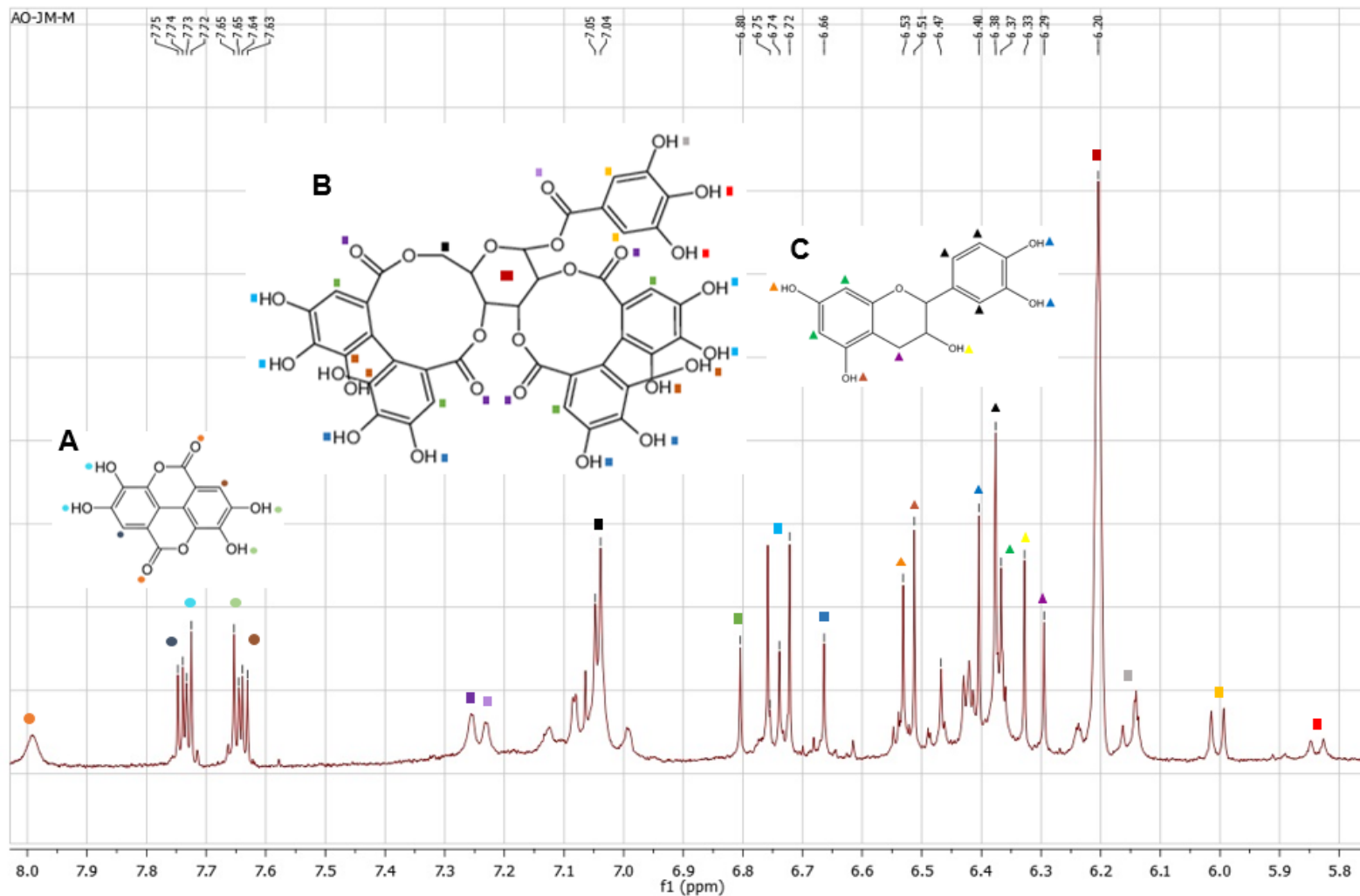


Figura 23. Espectro de la FRP de *Rubus liebmannii* por RMN ^1H . **A:** Ácido eláxico y ^1H en círculos; **B:** Casuarictina y ^1H en cuadros; **C:** (Epi)Catequina y ^1H en triángulo. ppm: partes por millón.

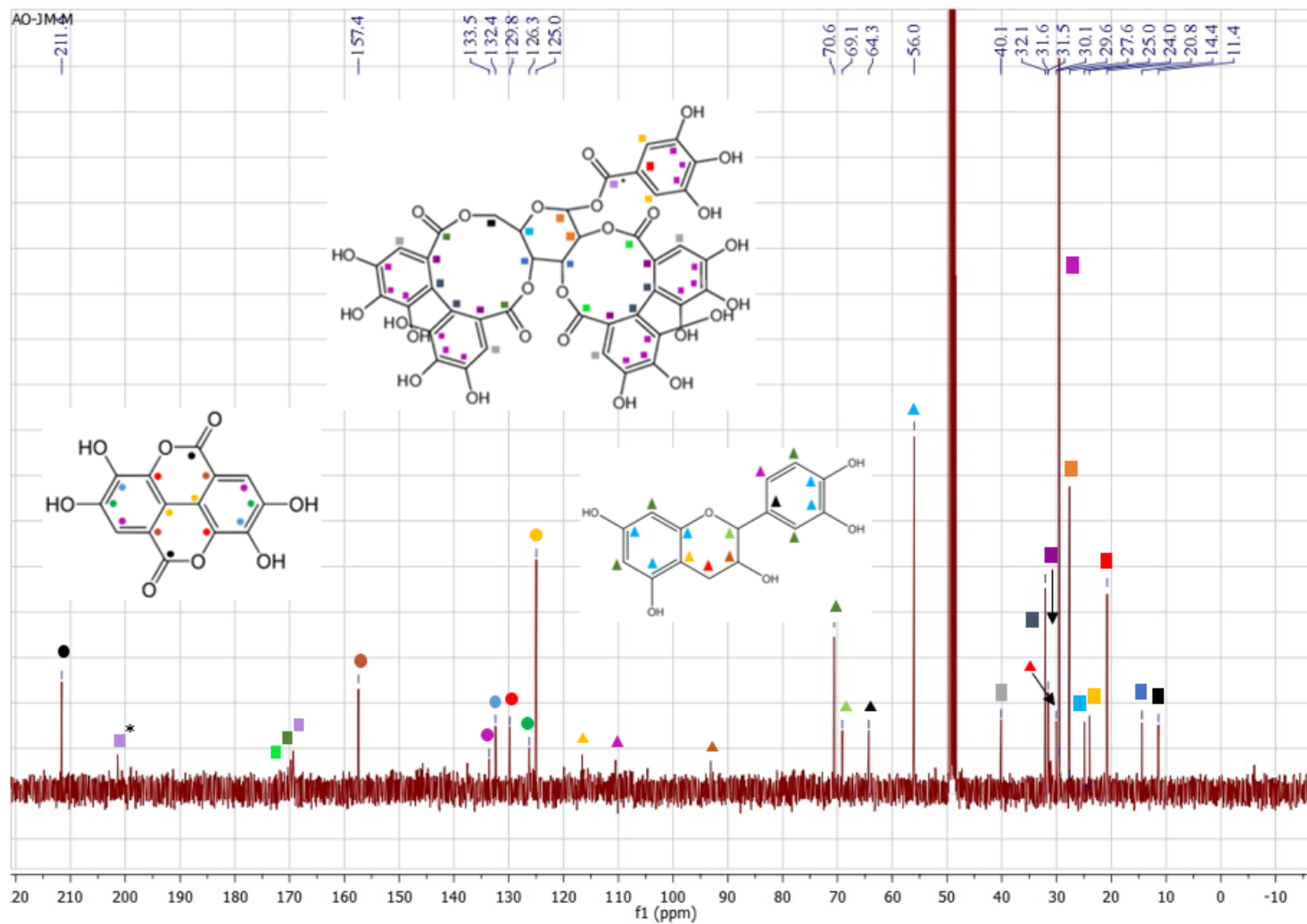


Figura 24. Espectro de la FRP de *Rubus liebmannii* por RMN ^{13}C . **A:** Ácido elágico y ^{13}C en círculos; **B:** Casuarictina y ^{13}C en cuadros; **C:** (Epi)Catequina y ^{13}C en triángulo. ppm: partes por millón. * C = O de sanguíina.

podimos determinar la presencia de sangüína H-6 y lambertianina B, debido a la aparecieron las señales de ambas moléculas, cuya diferencia única radica en la configuración del carbonilo (C = O) del grupo galoil unido a la pentosa de la molécula (**Figura 24B**), donde el C = O de sangüína se ajusta de manera ecuatorial al galato (indicado con el recuadro violeta y *) (**Figura 24**), mientras que el C = O de lambertianina A aparece junto a los otros C = O de la molécula (recuadro violeta sin un *), cuya configuración es cis (Kool y col., 2010; Vrhovsek y col., 2012).

Por otra parte, las pruebas de RMN ¹H de la FRP de *Rubus palmeri* confirma la presencia de taninos hidrolizables (ácido elágico y derivados de casuarictina); entre estos sangüínas y lambertianinas (**Figura 27**). La (epi)galocatequina, observada en el espectro de MS/MS, no pudo ser detectada mediante este análisis. Una prueba posterior por RMN ¹³C arrojó cuatro señales predominantes en el espectro, sin embargo, no fueron lo suficientemente buenas para poder ser usadas para identificar la mezcla compleja de compuestos que concordara con el espectro de MS/MS para la misma fracción.

Los taninos hidrolizables, como ácido elágico, sangüínas y lambertianinas taninos condensados como (epi)catequina y (epi)galocatequina, se han encontrado en genotipos silvestres y domesticados de *Rubus* de distintas partes del mundo, siendo importantes compuestos fitoquímicos de defensa ante agentes de estrés ambiental y que le dan un elevado valor nutracéutico para su aprovechamiento alimenticio y farmacológico (Gudej y col., 2004; Nagle y col., 2006; Acosta-Montoya y col., 2010; Cuevas-Rodríguez y col., 2010; Lee y col., 2012 Paudel y col., 2013; Paudel y col., 2014; Oszmański y col., 2015).

C CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES DE FRUTOS DE *R. liebmannii* Y *R. palmeri*

El método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) permite evaluar la capacidad antioxidante de compuestos encontrados en los alimentos y otras muestras biológicas en pruebas *in vitro* (Cao y col., 1999). Este método es empleado con frecuencia para determinar la actividad antioxidante de frutos de *Rubus* y otras frutillas (Moyer y col., 2002)

En el **Cuadro 10** se muestran los valores de capacidad antioxidante de extractos de frutos, ricos en polifenoles, antocianinas y taninos de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*. De manera evidente podemos afirmar que el proceso de purificación de las fracciones, empleando resinas y solventes, favorece el incremento de la capacidad antioxidante de las muestras.

Los frutos de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri* mostraron un ORAC de 277.35 y 249.15 $\mu\text{mol ET/g bs}$, respectivamente. Nuestros resultados concuerdan con aquellos reportados por Cuevas-Rodríguez y col. (2010) de 169.9 a 361 $\mu\text{mol ET/g bs}$ en 6 genotipos de frutos en *Rubus* mexicanas. Sin embargo, nuestros valores se encuentran por debajo de lo indicado por Acosta-Montoya y col. (2010), quienes reportan una capacidad antioxidante de 64 $\mu\text{mol ET/g ff}$ y de 432 $\mu\text{mol ET/g bs}$ en frutos de *Rubus adenotrichus*.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante del fruto liofilizado y las fracciones de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*.

<i>Fracción</i>	Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol ET/g}$)	
	<i>Rubus liebmannii</i>	<i>Rubus palmeri</i>
<i>Fruto</i>	277.4 ± 9.5^a	249.2 ± 8.9^b
<i>FNP</i> ²	58.9 ± 0.9^a	52.3 ± 2.4^b
<i>FCHO</i> ³	769.1 ± 62.4^a	783.4 ± 39.7^a
<i>FPA</i>		
<i>FP</i>	$2,921.2 \pm 97^a.4$	$2,280.2 \pm 126.2^b$
<i>FPS</i>		
<i>FRA 1</i>	$3,755.0 \pm 108.2^a$	$3,630.3 \pm 72.2^a$
<i>FRA 2</i>	$3,661.8 \pm 72.8^a$	$2,807.9 \pm 232.9^{cd}$
<i>FRA 3</i>	$3,397.2 \pm 122^d$	$2,633.1 \pm 41.8^d$
<i>FRA 4</i>	$3,098.9 \pm 43.6^c$	$2,538.8 \pm 78.3^d$
<i>FRA 5</i>	$3,306.2 \pm 182.6^d$	$2,642.1 \pm 193.7^d$
<i>FRP 1</i>	$3,175.9 \pm 143.7^c$	$3,099.3 \pm 180.6^c$
<i>FRP 2</i>	$5,143.8 \pm 124.9^a$	$4,908.1 \pm 54.3^b$

*FL: Fracción Lipídica; FPA: Fracciones Post Resina Amberlite; FPS: Fracciones Post Resina Sephadex; FCHO: Fracción de Carbohidratos; FRP: Fracción Rica en Polifenoles; FA: Fracción de Antocianinas; FP: Fracción de Proantocianidinas. Los resultados se muestran en: ¹ μMol equivalentes de trolox (ET)/g de fracción (bs); ² $\mu\text{Mol ET/mg}$ de la FNP; ³ $\mu\text{Mol ET/mg}$ de la FCHO (bs). * Diferencia significativa dentro de la misma fila; letras diferentes indican diferencia significativa entre celdas, ambos a una $P < 0.05$ con prueba estadística de Tukey.*

La capacidad antioxidante determinada para compuestos lipofílicos en las fracciones de compuestos de no polares (FNP), fueron en *Rubus liebmannii* (58.9 $\mu\text{mol ET/mg bs}$) y para *Rubus palmeri* (52.3 $\mu\text{mol ET/mg bs}$) (**Cuadro 10**). Esta capacidad antioxidante podría deberse a los compuestos químicos presentes en los frutos de zarzamoras silvestres como α -tocoferol, antioxidante liposoluble precursor químico de varios compuestos como la vitamina E (USDA, 1999). Existe poca información en literatura científica que nos permita validar nuestros resultados con respecto a otras especies de *Rubus* empleando este método.

Con respecto, a fracciones ricas en carbohidratos (FCHO) estos mostraron valores de ORAC de 769.1 $\mu\text{mol ET/g bs}$ en *Rubus liebmannii* y 783.4 $\mu\text{mol ET/g bs}$ en *Rubus palmeri*. La FCHO mostró un ORAC 3 veces superior a la del fruto de zarzamora silvestres colectadas en Noroeste de México. Para las fracciones ricas en polifenoles (FP) ambas especies, los valores de ORAC observados fueron de 2,921.2 y 2,280.2 $\mu\text{mol ET/g bs}$, para *Rubus liebmannii* y *palmeri*, respectivamente. El proceso de semipurificación a través de Amberlite XDA-7 permitió incrementar la capacidad antioxidante en 10.5 veces para *Rubus liebmannii* y 9.2 veces para *Rubus palmeri* con respecto al fruto de zarzamora silvestre objeto de este estudio.

Para las fracciones ricas en antocianinas (FRA), la actividad antioxidante varió 3,098.9 a 3,755.0 $\mu\text{mol ET/g bs}$ en *Rubus liebmannii* y de 2,538.8 a 3,630.3 $\mu\text{mol ET/g}$ en *Rubus palmeri* (**Cuadro 10**). De manera comparativa, la FRA presenta un ORAC 13.6 veces superior al fruto de *Rubus liebmannii* y 14.6 veces con respecto a frutos de *Rubus palmeri*. Estos resultados concuerdan con aquellos valores de

ORAC obtenidos para *Rubus* silvestres y domesticadas en México por Cuevas-Rodríguez y col., (2010).

La actividad antioxidante en fracciones ricas en proantocianidinas (FRP) el **Cuadro 10** muestra valores máximos de 5,143.8 y 4,908.1 $\mu\text{mol ET/g}$ para *Rubus liebmannii* y *palmeri*, respectivamente. Esto valores de actividad antioxidante representa un incremento de 18.5 veces mayor con respecto al fruto en *Rubus liebmannii* y de 19.y veces mayor en *Rubus palmeri*, lo que indica que la purificación con la resina Sephadex LH-20 permite la concentración de compuestos fitoquímicos que podría estar asociados con capacidad antioxidante de estos frutos silvestres recolectados en Estado de Sinaloa.

D EVALUACIÓN DE LABIOACTIVIDAD DE FITOQUÍMICOS DE *Rubus* SILVESTRES

1 Actividad antioxidante sobre células HepG2

El ensayo de actividad antioxidante celular (CAA) se utilizó para cuantificar el efecto antioxidante de antocianinas y proantocianidinas de frutos de *Rubus liebmannii* y *palmeri*. Este método mide la habilidad de los compuestos en prueba de prevenir la formación del compuestos fluorescente diclorofluoresceína (DCF), al ser oxidados por el agente 2,2'-azobis(2-aminopropano) dihidroxiclorado a partir del compuesto diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (no fluorescente en su forma reducida), generando radicales peroxil sobre una línea celular de hepatocarcinoma humano, llamada HepG2 (Wolfe y Liu, 2007). En este experimento se compararon los resultados del decremento de fluorescencia en células expuestas a los

compuestos fenólicos de frutos de *Rubus* contra las células del control, lo cual se relaciona con la capacidad de evitar y/o disminuir la oxidación de la DCFH-DA por el fitoquímico en prueba.

Los valores de EC_{50} (mg/mL) indican la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de fluorescencia de la DCF por la oxidación producida por los radicales peróxido en células HepG2 en comparación con el blanco. Esto significa que mientras más bajo sea el valor de EC_{50} de una muestra, mayor será su actividad antioxidante. La oxidación de DCFH fue inhibida por los protocolos con y sin lavado con PBS entre la aplicación de los extractos y tratamiento con AAPH.

En el **Cuadro 11** se muestran los resultados de esta prueba para las FRA de *Rubus liebmannii* y *palmeri*. Comparando el protocolo de lavado vs el protocolo sin lavado, este último mostró valores de EC_{50} menores que los del primero en ambas especies, se presenta mayor actividad antioxidante intracelular cuando ocurre un lavado de muestras con PBS. Esto podría deberse a la naturaleza de los compuestos de las muestras, así como su biodisponibilidad. Los resultados indican que los tratamientos presentan diferencias significativas entre las distintas concentraciones, sin embargo no existe un comportamiento dosis-dependiente marcado de las concentraciones de antocianina de ambas especies sobre el efecto inhibitorio de la fluorescencia en las muestras. A pesar de ello, se puede ver diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos sin lavado con PBS y los que se lavaron en cuanto a valores referentes al EC_{50} y AAC.

Cuadro 11. Actividad antioxidante celular (AAC) de fracciones ricas en antocianinas (FRA) de las especies silvestres de *Rubus*

Especie	CA ($\mu\text{g/mL}$)	EC ₅₀ (mg/mL)		AAC ($\mu\text{mol EQ}/\mu\text{g bs}$)	
		Sin Lavado	Con Lavado	Sin Lavado	Con Lavado
<i>Rubus liebmannii</i>	0.1	93 \pm 16.37 ^a	16.33 \pm 0.58 ^e	19.59 \pm 3.45 ^A	3.44 \pm 0.12 ^E
	1	73 \pm 3.6 ^b	15.35 \pm 0.58 ^e	15.38 \pm 0.76 ^A	3.23 \pm 0.12 ^E
	10	71.66 \pm 4.04 ^b	13.67 \pm 1.54 ^e	15.10 \pm 0.85 ^B	2.87 \pm 0.24 ^F
	100	77.33 \pm 12.66 ^{abc}	14 \pm 1.73 ^e	16.30 \pm 2.61 ^{AB}	2.95 \pm 0.37 ^E
	200	65.66 \pm 1.53 ^{bc}	13.33 \pm 1.15 ^e	13.83 \pm 0.32	2.81 \pm 0.24 ^F
<i>Rubus palmeri</i>	0.1	77.33 \pm 6.02 ^{ab}	13.67 \pm 0.58 ^e	14.95 \pm 1.16 ^B	2.64 \pm 0.11 ^F
	1	92.33 \pm 15.74 ^{ab}	15.67 \pm 2.08 ^e	17.85 \pm 2.86 ^{AB}	3.03 \pm 0.40 ^{EF}
	10	89.66 \pm 4.04 ^a	15.33 \pm 1.53 ^e	17.33 \pm 0.78 ^A	2.96 \pm 0.30 ^{EF}
	100	63 \pm 2 ^{bc}	14.0 \pm 0 ^e	12.18 \pm 0.39 ^C	2.71 \pm 0.0 ^F
	200	48 \pm 2.65 ^d	15 \pm 1 ^e	9.28 \pm 0.51 ^D	2.90 \pm 0.19 ^F

CA. Concentración de antocianinas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey.

Cuadro 12. Actividad antioxidante celular (AAC) de fracciones ricas en proantocianidinas (FRP) de las especies silvestres de *Rubus*.

Especie	CA ($\mu\text{g/mL}$)	EC ₅₀ (mg/mL)		AAC ($\mu\text{mol EQ}/\mu\text{g bs}$)	
		Sin Lavado	Con Lavado	Sin Lavado	Con Lavado
<i>Rubus liebmannii</i>	0.1	193.33 \pm 2.89 ^a	63.67 \pm 9.45 ^e	13.79 \pm 0.42 ^A	4.54 \pm 1.39 ^C
	1	174.67 \pm 5.13 ^b	65.67 \pm 4.16 ^e	12.45 \pm 1.41 ^A	4.68 \pm 0.76 ^C
	10	78.67 \pm 2.31 ^d	34.33 \pm 4.16 ^h	5.61 \pm 0.39 ^C	2.45 \pm 0.32 ^{DE}
	100	36 \pm 6 ^{gh}	35.33 \pm 12.0 ^{fgh}	2.57 \pm 0.71 ^{DE}	2.52 \pm 1.01 ^{DE}
	200	34.67 \pm 2.31 ^h	22 \pm 6.08 ⁱ	2.47 \pm 0.45 ^{DE}	1.57 \pm 0.13 ^E
<i>Rubus palmeri</i>	0.1	162 \pm 4 ^c	49 \pm 1 ^f	10.33 \pm 0.81 ^A	3.12 \pm 0.48 ^D
	1	151 \pm 7.07 ^c	60.33 \pm 4.24 ^e	9.63 \pm 1.88 ^A	3.84 \pm 0.76 ^D
	10	155.33 \pm 10.26 ^c	60.67 \pm 7.37 ^e	9.90 \pm 0.72 ^B	3.87 \pm 0.28 ^D
	100	43.33 \pm 3.21 ^g	27.33 \pm 2.51 ⁱ	2.76 \pm 0.49 ^D	1.74 \pm 0.18 ^E
	200	32.67 \pm 2.08 ^h	22.33 \pm 0.57 ^j	2.08 \pm 0.41 ^E	1.42 \pm 0.07 ^F

CP. Concentración de proantocianidinas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey.

En el **Cuadro 12** se ilustra la AAC de las fracciones ricas en proantocianidinas (FRP) de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri*. En este recuadro se puede apreciar que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas concentraciones probadas sobre las células. Pese a ello, no existe un comportamiento dosis-dependiente en cuanto al grado de inhibición de fluorescencia ni diferencias marcadas entre los tratamientos con lavado y los tratamientos sin lavado. Esta evidencia nos sugiere que la mayoría de los taninos presentes en las FRP pueden ser asimilados por las células, por lo que no reaccionan a nivel extracelular.

2 Efecto citotóxico de las fracciones sobre células C6 y RG2

El efecto citotóxico es aquel fenómeno en el que un agente tóxico ejerce su acción sobre una célula. Estos agentes pueden ser de distinta naturaleza y las consecuencias que generan son muy variables, desde generar alteraciones en la fisiología y la morfología de las células (Riss y Moravec, 2004). Acorde a lo anterior, se evaluaron diversas fracciones de frutos de ambas especies de zarmoras (24 y 48 h, con 9 concentraciones, en ambas líneas celulares). Los resultados se determinaron espectrofotométricamente por tinciones de cristal violeta y fueron corroborados con rojo neutro. La mayoría de los 20 extractos (17 de ellos) presentaron un efecto proliferativo en ambas líneas celulares, debido a que no se observó una declive en la viabilidad celular, excepto para 3 fracciones; FRA 1 y FRP 7, respectivamente en *Rubus liebmannii*; y la FNP en *Rubus palmeri* (**Cuadros 13 y 14**).

La línea C6 mostró gran resistencia al efecto citotóxico potenciado por los extractos, ya que en la mayoría de los casos se observó un crecimiento celular

superior al de los controles. La Fracción 1 de antocianinas (FRA1) de *Rubus liebmannii* mostró efecto antiproliferativo sobre la línea RG2 a 48 h de exposición (**Figura 25**). Ninguna otra fracción de antocianinas indicó generar daño celular sobre

Cuadro 13: Citotoxicidad sobre células C6 a 24 y 48 h de exposición a las FP, FRA, FRP y FNP de ambas especies.

TExp (h)	Esp.	Fracciones Probadas	Viabilidad Celular (%)									Obs.		
			Dosis aplicadas (µg/mL)											
			0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	100	250			
24	<i>Rubus liebmannii</i>	FP	1	>100	83.1	>100	>100	87.9	>100	>100	>100	62.7	CV	
			1	96	82.3	71.9	78.9	74.7	75.6	74	78.6	72.3	CDD	
		FRA	2	96.6	97.5	93.3	90	73.6	79.1	91.3	74.1	74.9	CV	
			3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SIC
			4	96.1	85.1	83.7	82.2	65.1	96.1	90	>100	>100	CV	
		FRP	5	>100	88.1	90.3	85.8	85.3	96.6	85.6	>100	>100	CV	
			1	84.4	98.4	>100	>100	>100	91.1	81.7	>100	>100	CV	
		FNP	2	89.4	97.1	95.8	92.8	84.4	78.2	64.1	57.9	49.0	CDD	
	1		>100	98.7	98	99.1	97.7	96.5	93.1	88.2	79.4	CDD		
	<i>Rubus palmeri</i>	FP	1	85.2	92.6	>100	>100	68.6	61	>100	>100	90.9	CV	
			1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SIC	
			2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SIC	
		FRA	3	>100	84.4	77.7	72.0	67.2	85.5	93.3	>100	97.6	CV	
			4	>100	>100	78	90.2	85.8	97.2	60.8	89.2	87.8	CV	
5			98.2	>100	92.4	86.3	96.8	81.6	75.2	74.4	75.9	CDD		
FRP		1	87.1	99.5	67.9	>100	91.5	85.5	>100	>100	>100	CV		
		2	>100	67.5	>100	97.6	88.3	96.7	89.9	99.8	89.7	CV		
FNP	1	>100	>100	>100	>100	>100	99.1	99	98.4	98.1	CDD			

48	<i>Rubus liebmannii</i>	FP	1	90.5	69.6	65.5	49.9	35.3	52.5	56.5	63.7	97.2	CV	
			1	90.7	81.8	83.2	89.9	>100	>100	81.7	62.5	60.8	CV	
			2	79.6	>100	99.9	78	60.6	78.1	76.5	93.7	90.4	CV	
		FRA	3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SEC	
			4	84.8	68.6	65.7	53.3	44.2	64.8	54.1	60.0	81.6	CV	
			5	57.8	49.5	42.4	46	43.8	43.7	67.0	73.7	46.6	CV	
		FRP	1	86.3	98.8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	94.3	CV
			2	70.1	>100	66.4	62.3	57.5	53.7	52.0	48.1	28.0	CDD	
		FNP	1	>100	>100	>100	>100	>100	98.7	>100	90.3	89.1	CV	
		<i>Rubus palmeri</i>	FP	1	66.0	>100	75.5	66.6	64.8	43.7	>100	79.8	>100	CV
	1		90.7	81.8	83.2	89.9	94.9	94.5	66.9	62.5	60.8	CDD		
	2		>100	>100	66.3	>100	56.0	64.6	82.7	58.2	58.9	CV		
FRA	3		68.9	68.7	61.2	47.3	40.5	51.5	52.9	61.9	83.8	CV		
	4		81.5	99.6	53.9	80.2	45.5	50.9	54.0	46.3	46.4	CDD		
	5		84.0	>100	77.9	76.6	63.5	50.5	57.9	62.9	60.8	CV		
FRP	1		>100	91.6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SEC		
	2		70.1	>100	66.4	62.3	57.5	53.7	52.0	48.1	28.0	CDD		
FNP	1		93.6	84.8	81.3	83.3	15.7	14.2	15.8	12.9	13.0	CDD		

Tratamientos seleccionados para posteriores pruebas. **TExp**: Tiempo de exposición en horas; **CV**: Comportamiento variable; **CDD**: Comportamiento dosis dependiente; **SEC**: Sin inhibición celular.

Cuadro 14: Citotoxicidad sobre células RG2 a 24 y 48 h de exposición a las FP, FRA, FRP y FNP de ambas especies.

TExp (h)	Esp.	Fracciones Probadas	Viabilidad Celular (%)									Obs.		
			Dosis aplicadas (µg/mL)											
			0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	100	250			
24	<i>Rubus liebmannii</i>	FP	1	74.2	>100	56.9	86.4	83.9	86.4	68.8	70.7	58.9	CV	
			1	88.7	>100	86.0	85.3	>100	90.9	95.0	90.3	92.4	CDD	
		FRA	2	>100	>100	99.9	>100	62.8	>100	>100	>100	>100	>100	CV
			3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SEC
			4	92.3	78.1	82.4	81.7	71.2	>100	89.6	98.8	>100	CV	
		FRP	5	98.2	71.9	78.7	76.5	72.4	73.1	90.9	78.1	87.3	CV	
			1	83.0	66.3	63.4	78.7	63.1	63.2	46.7	44.8	44.0	CV	
		FNP	2	76.9	>100	70.3	62.6	58.3	57.2	38.3	24.1	13.8	CDD	
			1	99.9	98.7	98.0	97.5	96.0	95.4	91.3	85.7	85.1	CDD	
		<i>Rubus palmeri</i>	FP	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	89.5	62.4	CV
	1			>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SEC	
	FRA		2	>100	>100	93.3	73.9	91.6	87.5	90.0	>100	94.7	SEC	
			3	>100	>100	93.9	79.7	85.7	>100	88.4	94.5	>100	CV	
			4	>100	>100	>100	>100	83.9	>100	>100	97.4	98.0	CV	
FRP	5		>100	>100	>100	>100	85.5	72.9	>100	94.6	86.3	CDD		
	1		>100	>100	90.4	98.6	84.3	57.9	91.1	69.7	68.3	CV		
FNP	2		96.7	79.6	81.9	79.8	82.8	66.7	52.9	38.6	63.9	CV		
	1		>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	CDD		

Esp.	Fracciones Probadas		Viabilidad Celular (%)									Obs.		
			Dosis aplicadas (µg/mL)											
			0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	100	250			
48	<i>Rubus liebmannii</i>	FP	1	1	>100	90.1	99.2	89.2	74.1	85.7	90.1	>100	CV	
		FRA	1	1	88.7	>100	86.0	85.3	52.4	90.9	35.0	30.3	CDD	
			2	91.1	95.6	79.3	70.6	74.2	71.1	72.5	77.7	79.0	CV	
			3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	SEC
			4	88.2	80.1	67.2	76.8	85.7	87.7	76.8	67.8	68.4	CV	
			5	>100	78.8	69.3	63.3	74.3	84.6	59.4	49.2	30.5	CV	
		FRP	1	99.8	50.6	68.2	76.8	58.3	80.5	62.8	99.5	78.3	CV	
			2	74.8	70.1	63.8	58	88.4	57.1	38	22.9	12.7	CDD	
		FNP	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	99.8	97.0	CDD
		<i>Rubus palmeri</i>	FP	1	91.0	>100	>100	82.8	87.5	58.9	70.9	73.5	>100	CV
				1	>100	64.1	62.4	56	62.3	70.8	51.8	44.3	44.0	SEC
				2	>100	>100	>100	>100	86.3	80.1	90.9	75.1	71.0	SEC
			FRA	3	>100	>100	96.8	>100	90.9	>100	>100	80.4	74.8	CV
4	>100			>100	>100	69.7	62	78.9	76.0	47.8	35.1	CV		
5	92.3			88.9	81.4	82.7	75.6	70.0	87.7	53.2	71.9	CDD		
FRP	1		85.8	72.6	>100	>100	>100	68.3	75.4	59	48.1	CV		
	2		>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	CV	
FNP	1		90.1	85.0	94.2	81.6	70.7	54.2	75.1	70.9	25.5	CDD		

Tratamientos seleccionados para posteriores pruebas. **TExp**: Tiempo de exposición en horas; **CV**: Comportamiento variable; **CDD**: Comportamiento dosis dependiente; **SIC**: Sin inhibición celular

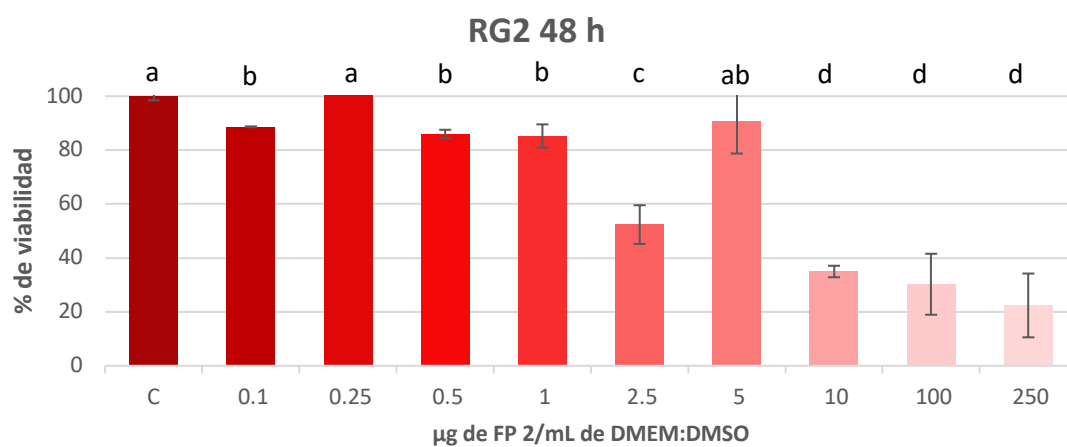


Figura 25. Viabilidad de células RG2 tratadas con la fracción rica en antocianinas (FRA) de *Rubus liebmanni* por 48 h. * tratamientos seleccionados para posteriores pruebas.

alguna de estas líneas en ambos tiempos. No se observó tampoco efecto de las fracciones de proantocianidina (FRP) en *Rubus palmeri*, mientras para *Rubus liebmannii* se observó efecto citotóxico de una de las FRP2 a 24 y 48 h sobre ambas líneas tumorales (**Figuras 26**). De la fracción no polar (FNP) en *Rubus palmeri* se observó efecto a 48 horas de exposición sobre células C6 (**Figura 27**).

Por otra parte, la línea RG2 mostró menos tolerancia a concentraciones altas en extractos (> 250 µg/mL), lográndose los mejores resultados para FRP2 a 24 y 48 h (**Figura 26B y 26D**) y la FRA 1 a 24 h (**Figura 25**). Nuestros resultados no presentaron efecto en la FNP, FCHO y en las fracciones de frutos zarzamora silvestres.

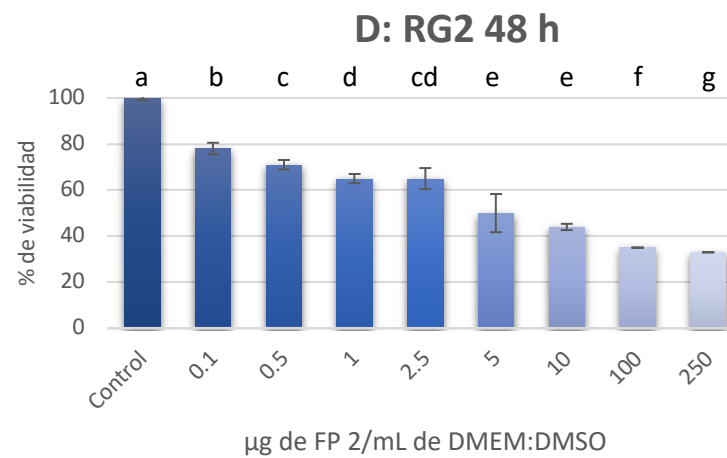
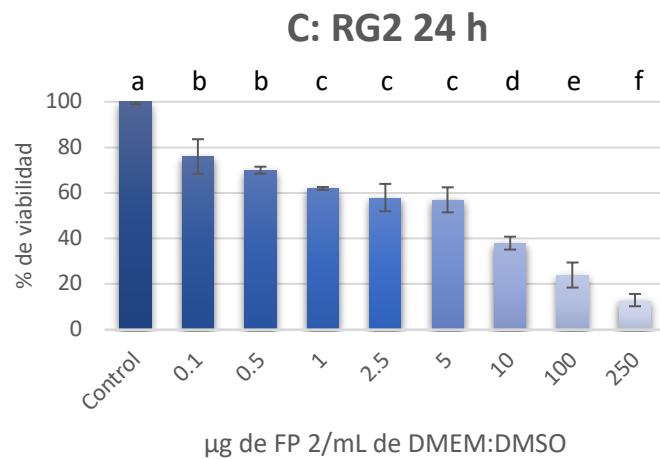
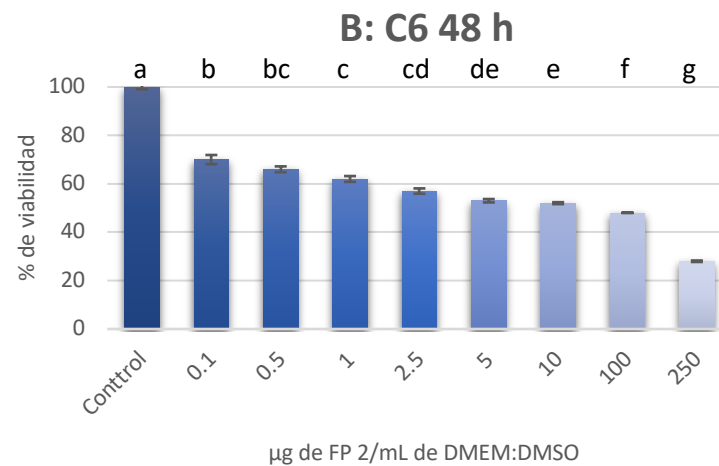
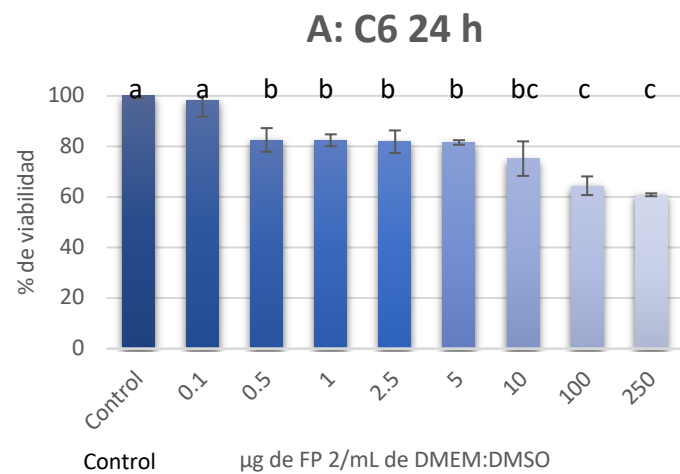


Figura 26. Viabilidad de células C6 y RG2 tratadas con la FRP *Rubus liebmannii* por 24 y 48 h.

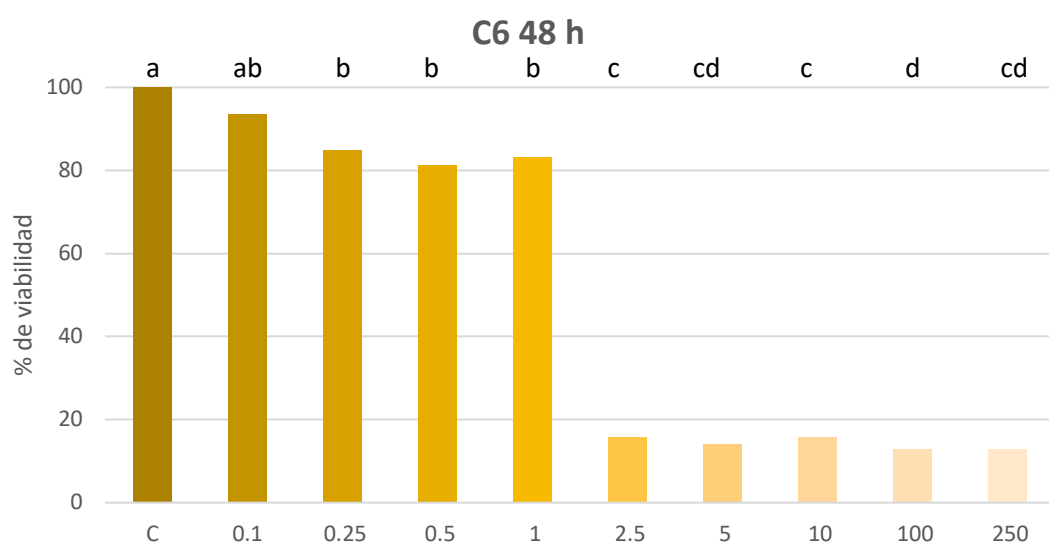


Figura 27. Viabilidad de células C6 tratadas con la fracción no polar (FNP) de *Rubus palmeri* por 48 h. *tratamientos seleccionados para posteriores pruebas.

3 Determinación de peroxidación lipídica:

En modelos *in vitro* los radicales libres y agentes prooxidantes provocan daños severos sobre funciones y estructuras celulares, que podrían conducir a su muerte. En células tumorales con sistemas apoptóticos mutados, el crecimiento y desarrollo basal no se ven detenidos y continúan de manera acelerada transportando a que las células cancerosas prosperen hacia células similares y otros tejidos (Linden y col., 2008). Debido a esto, la citotoxicidad es un medio alternativo para inducir la muerte celular por distintas vías, como lo es la lipoperoxidación (de Castro-de Pardo, 2006). La lipoperoxidación o peroxidación lipídica es un proceso químico en el que los radicales libres inician un proceso en cadena que comienza con la captación de electrones de compuestos lipídicos de las endo y exomembranas celulares. Generalmente ocurre sobre los ácidos grasos poliinsaturados membranales (como el ácido linolénico), gracias a los múltiples dobles enlaces que poseen hidrógenos reactivos disponibles (Ferreira de Araujo-Ribeiro y col, 2011). Poliinsaturados membranales (ácido linolénico), debido a sus múltiples dobles enlaces que poseen hidrógenos reactivos disponibles (Ferreira de Araujo-Ribeiro y col, 2011). La lipoperoxidación podría ser responsable de daños permanentes en membranas internas y externas de las células, cuando estas son expuestas en agente oxidante (Pérez-Gastell y Pérez-de Alejo, 2000). Sustancias antioxidantes con poder reductor alto (glutati6n, tocoferoles y polifenoles) a concentraciones altas podría generar da6o oxidativo permanente en membranas (prooxidantes), produciendo inestabilidad estructural en esta, lo que la conlleva a una desregulaci6n en el flujo de sustancias con la matriz extracelular (Lindel y col., 2008). Durante la peroxidaci6n lipídica se

generan varios aldehídos reactivos, siendo el malonaldehído (MDA) el más abundante (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Por tanto, la determinación de MDA por ácido tribarbitúrico (TBA) es uno de los ensayos más usados para determinar la lipoperoxidación, en el que se forma el complejo MDA-TBA y otros dos aldehídos. Los aldehídos insaturados producidos como el 4-hidroxinonenal es excepcionalmente reactivo y conduce a la producción de más productos citotóxicos de peroxidación lipídica (Colín-González y col., 2015).

Tomando como base lo anterior, se cuantificó el daño por peroxidación lipídica en las líneas C6 y RG2, con concentraciones que mostraron mejores valores de los ensayos citotóxicos de compuestos no polares, antocianinas, proantocianidinas. Los resultados indican que tratamiento con antocianinas (FRA2) de *Rubus liebmannii* en la línea C6 a 48 h de exposición generó incremento en la formación de MDA con porcentajes mayores al 7 y 45% para concentraciones de 0.1 y 10 µg/mL, respectivamente, en comparación con el control (**Figura 28A**).

Nuestros resultados de los tratamientos citotóxicos de proantocianidinas (FRP2) de *Rubus liebmannii* en ambas líneas celulares se obtuvieron mejores respuestas de viabilidad celular con concentraciones de 0.5 y 100 µg/mL para ambos tipos celulares (24 y 48 h) de exposición. Cuando se determinó efecto de lipoperoxidación observamos una mayor formación de MDA en células RG2 a 100 µg/mL (> 50%) en tratamientos de 24 h con respecto al control (C) (**Figura 28B**). Mientras que a 48 h bajo las mismas condiciones quien mostró porcentaje más alto de MDA con respecto a su control fue C6 con 100 µg/mL (> 80%) (**Figura 28C**).

Por otra parte, tomando como referencia a las evaluaciones citotóxicas se selecciono al tratamiento lipídico a 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre C6 a 48 h de exposición como las condiciones viables con respecto a los demas. Bajo estas condiciones observamos ue la formación de MDA es superior a 18% a las concentraciones señaladas con respecto al control (**Figura 28D**).

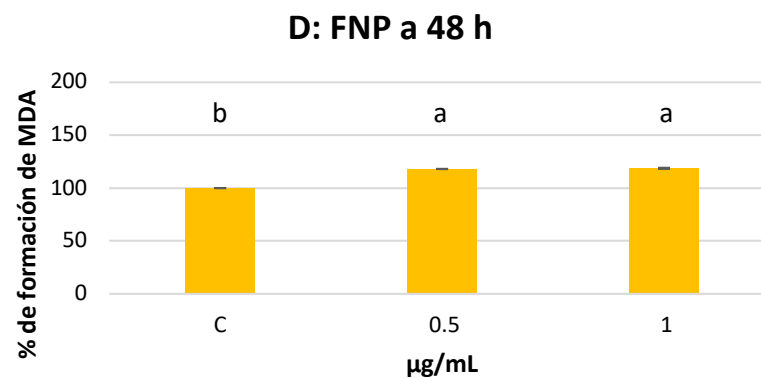
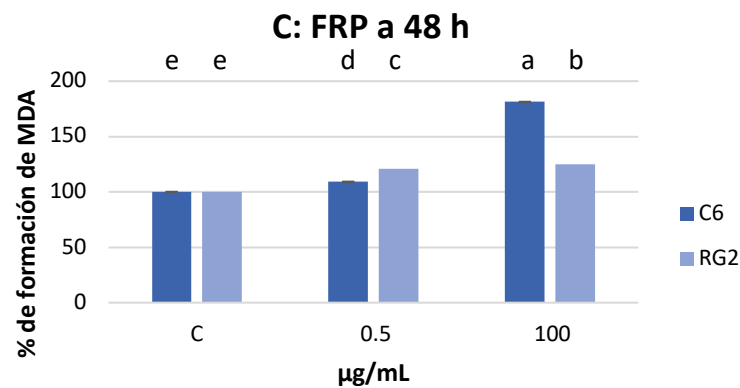
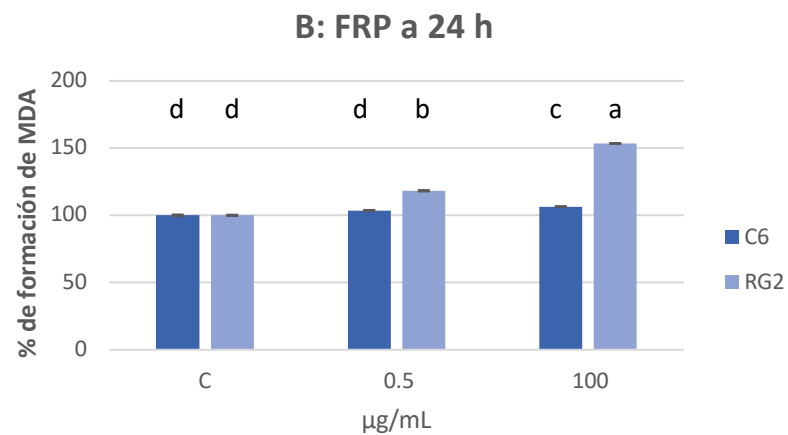
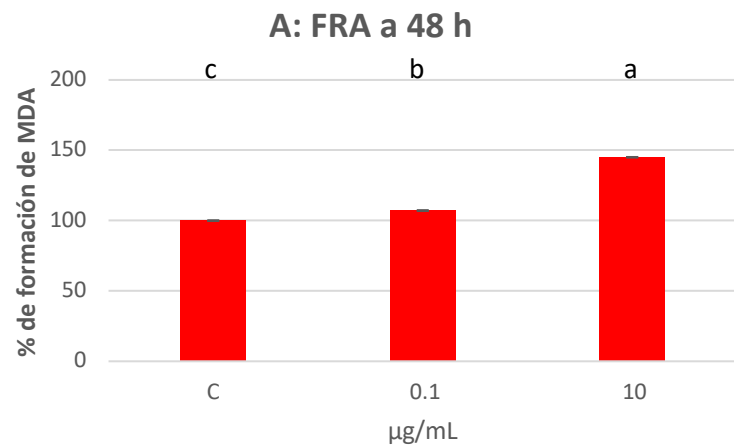


Figura 28. Formación de MDA por exposición de proantocianidinas sobre células C6 y RG2 a 24 h y 48 h.

4 Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS):

Además de las pruebas de lipoperoxidación, se midió la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) para ambas líneas celulares en ambos tiempos con tratamientos de los extractos de zarzamoras y de nanopartículas (**Figura 29 y 30**). En tratamientos sobre células C6 a 24 h sólo se observó efecto significativamente diferente al control en los que habían sido tratados con nanopartículas, inclusive sin extractos (**Figura 29**). Mientras que a 48 h de exposición el tratamiento de proantocianidinas (FRP 2) de *Rubus liebmannii* muestran efecto significativo sobre el control a concentración de 100 µg/mL con y sin nanopartículas (P 100 y PN 100), Además, la Fracción No Polar (EL) en *Rubus palmeri* a concentración de 1 µg/mL pero sólo sin nanopartículas presento efecto significativo. Asimismo, control con nanopartículas presenta incremento sobre el control sin estas.

Con respecto, en células RG2 a 24 h (**Figura 30**) se observa efecto diferente en tratamientos con nanopartículas así como concentración mayor de proantocianidinas a 100 µg/mL (P 100). Sin embargo, a 48 h observamos que la formación de ROS es significativamente menor que en el control en concentraciones menores de proantocianidinas (P 0.5) y antocianinas (A 0.1) sin nanopartículas, ambas en *Rubus liebmannii*, pero los tratamientos con mayor efecto significativo fueron aquellos realizados con nanopartículas y extractos con mayor concentración de antocianinas y proantocianidinas (10 y 100 µg/mL, respectivamente). No se aprecia diferencia significativa entre estos cuatro tratamientos.

Tomando como referencia los resultados anteriores, podemos concluir que fracciones ricas en antocianinas (FRA), proantocianidinas (FRP) y compuestos no

polares (FNP) de especies de *Rubus* silvestres colectadas en el Noroeste de México presentan efectos considerables sobre inducción de muerte celular por vías alternas sobre gliomas murinos.

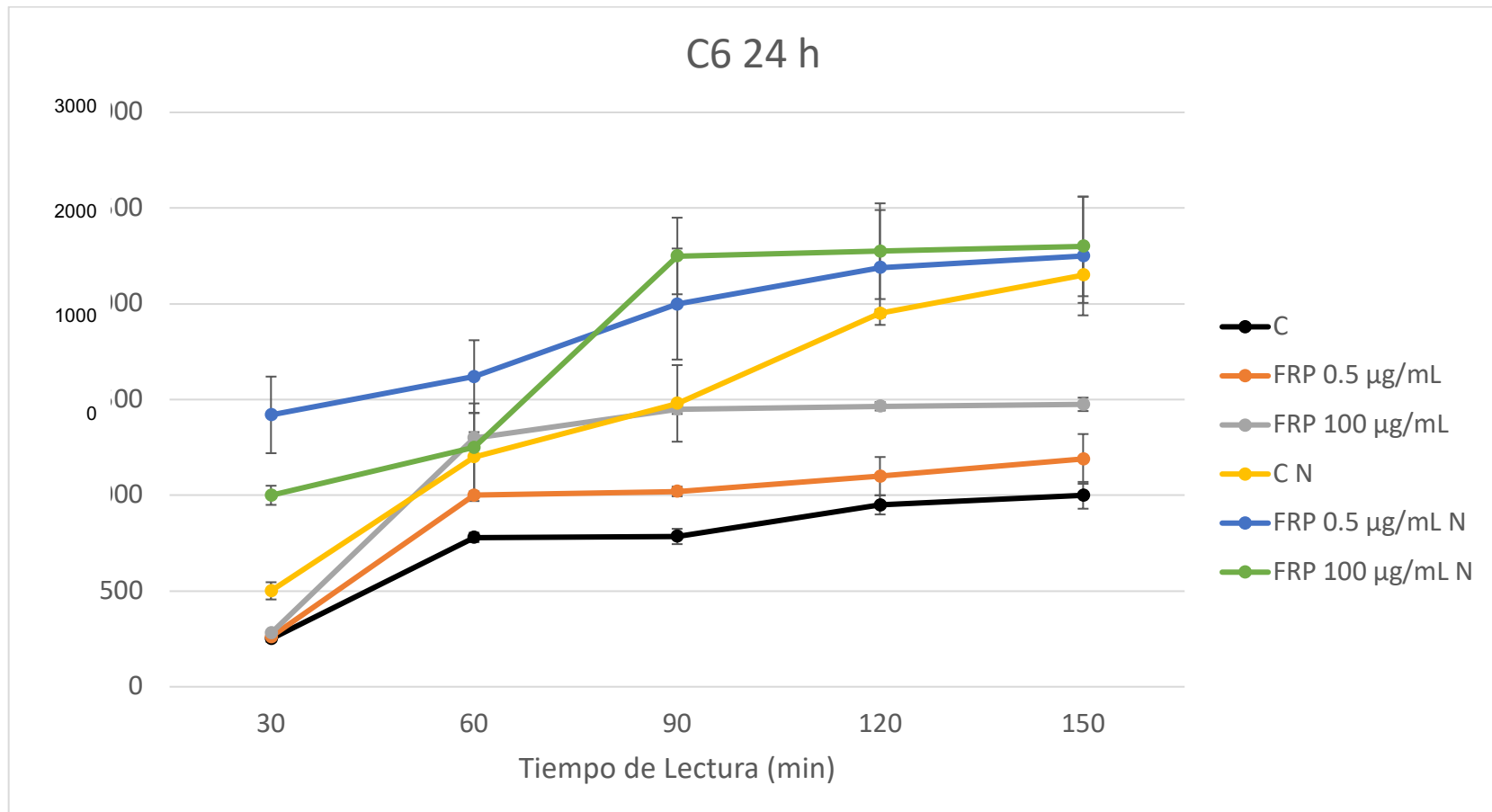


Figura 29 Formación de ROS sobre células C6 a 24 h de exposición. C: Control; FRP: FRP 0.5 µg/mL y FRP 100 µg/mL; N: Nanopartículas; con una n=3 en una prueba de Duncan a un $P<0.05$.

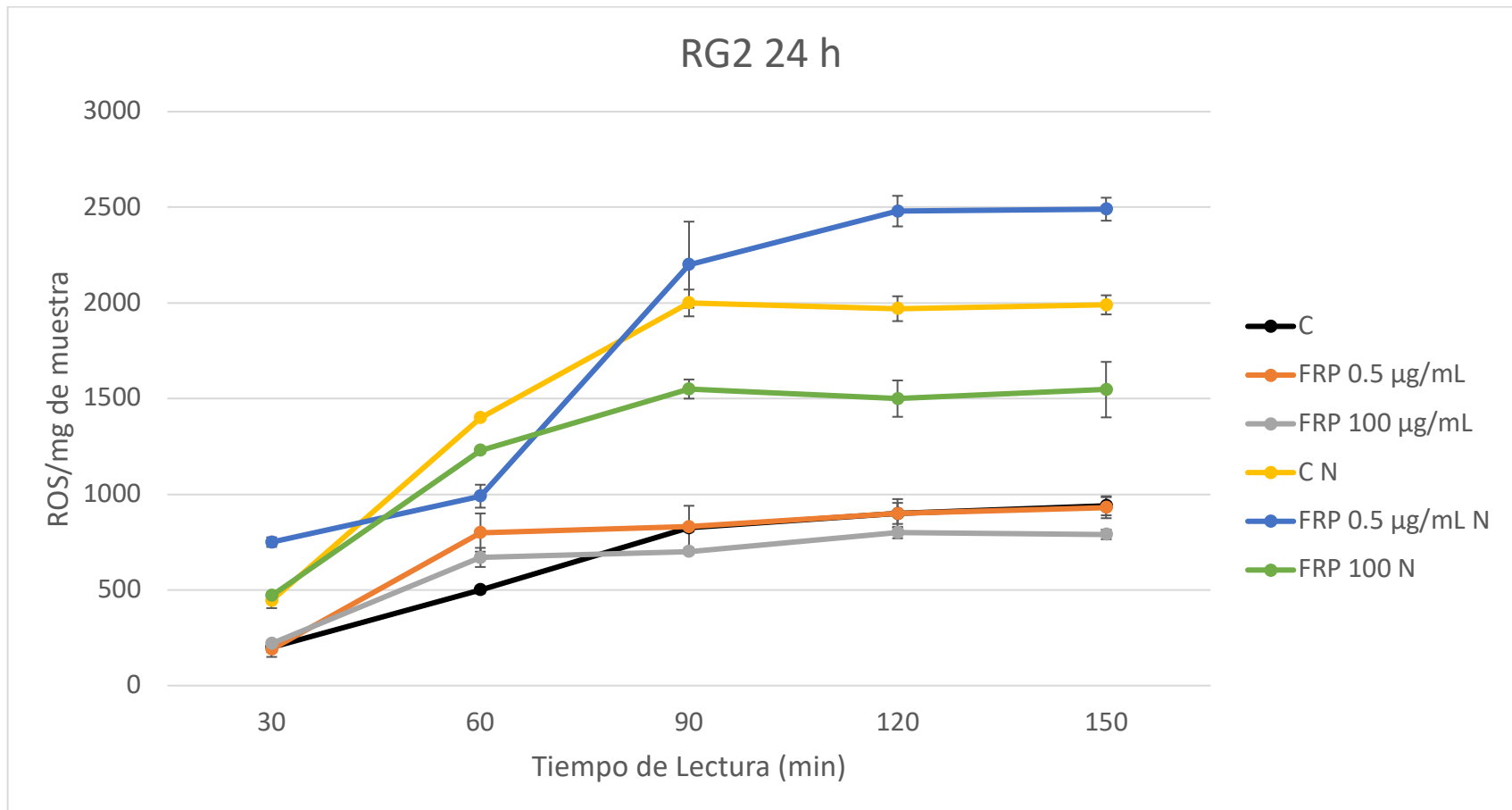


Figura 30. Formación de ROS sobre células RG2 a 24 h de exposición. C: Control; FRP: FRP 0.5 µg/mL y FRP 100 µg/mL; N: Nanopartículas; con una n=3 en una prueba de Duncan a un $P < 0.05$.

5 Determinación de genotoxicidad:

La genotoxicidad es la capacidad que tiene un agente de generar daño sobre algún componente importante del genoma; no sólo el ADN genómico, sino también sobre algunos de sus mecanismos de reparación, condensación y descondensación que comprometan el funcionamiento y comportamiento de estructuras tan grandes como cromosomas. Estos agentes pueden ser de naturaleza física (radiación, rayos UV) y química (pH, agentes rédox) capaces de alterar la información genética. Estos pueden unirse al ADN o actuar sobre enzimas reparadoras del ADN, que pierden la capacidad de corregir errores en el genoma, produciendo así mutaciones que pueden o no generar procesos cancerosos (Kolle, 2012). En algunas células tumorales, los mecanismos de reparación de ADN no están bien regulados por la mutación de uno o varios genes correctores de anomalías genéticas (Dauer y col, 2003; Azevedo y col, 2007), por tanto, al haber daño sobre este sistema, las células cancerígenas son susceptibles a no tolerar condiciones ante agentes genotóxicos y tienden a morir por vías necróticas y no por las apoptóticas (Proskuriakov y col, 2003).

La vía utilizada para evaluar la presencia de citotoxicidad por efecto genotóxico en ambas líneas celulares expuestas a los extractos seleccionados de *Rubus liebmanni* y *palmeri*, fue determinando la degradación de ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa. El mayor efecto genotóxico por degradación de ADN nuclear se observa en la **Figura 31**, en los carriles 3, 6, 11 y 16 (C6 24 h, RG2 24 h, C6 48 h y RG2 48 h, respectivamente) donde se muestran la degradación mayor (entre 6 y 4 kilobases) expuestos a una concentración de 100 µg de

proantocianidina/mL de DMEM:DMSO en comparaciones con sus respectivos controles sin tratamiento (carriles 1, 4, 7 y 12), donde la degradación prácticamente es nula. Estos valores concuerdan con los observados en las **Figura 31**, donde los porcentajes de viabilidad oscilaron desde 66 hasta 24% con respecto a sus controles.

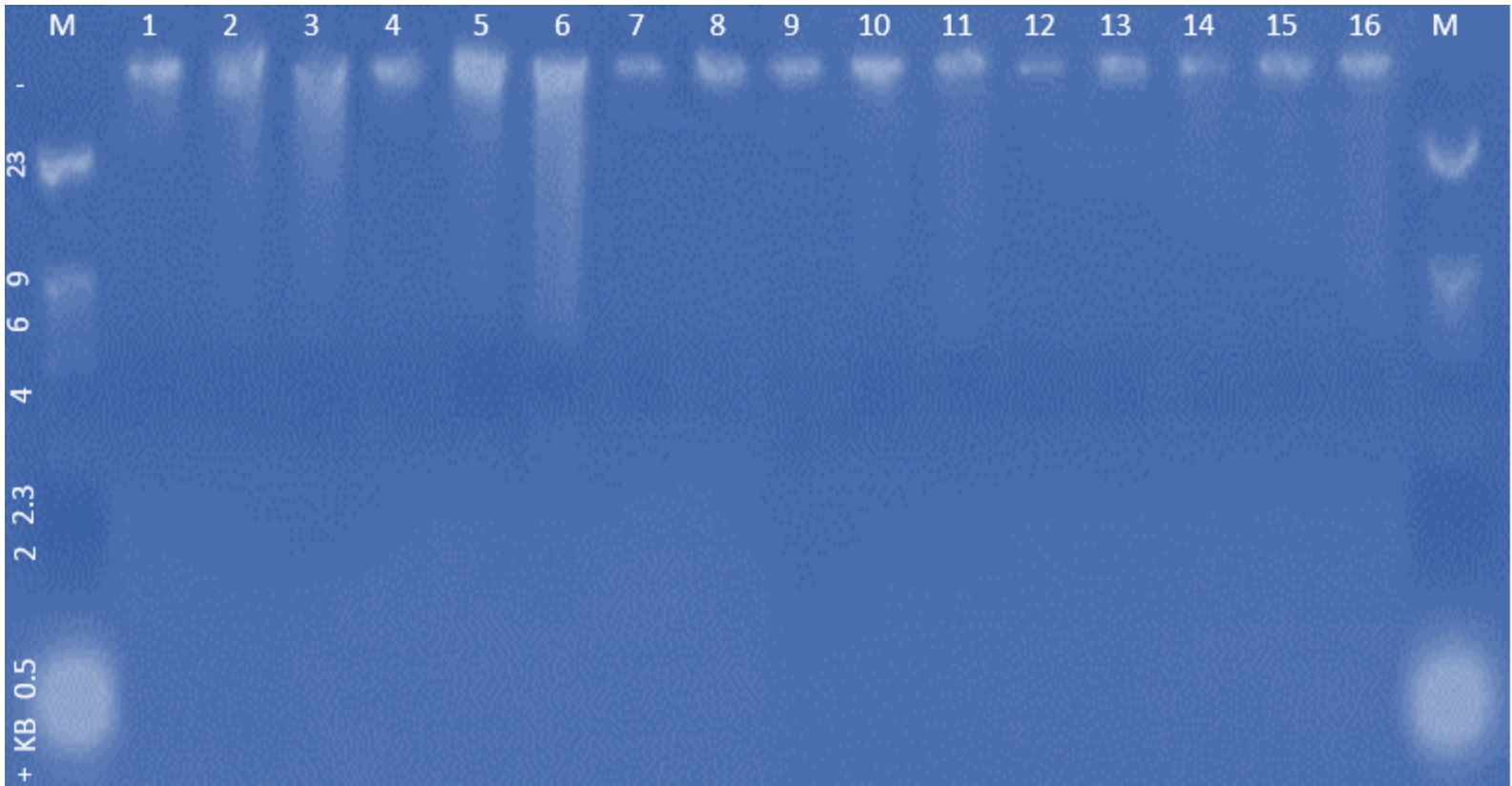


Figura 31. ADN teñido con ioduro de propidio en gel de agarosa.

VII. CONCLUSIONES

Se reportaron tres especies de zarzamoras silvestres en las inmediaciones del ejido El Palmito, Concordia, lo cual nos indica la permanencia de la especies en la zona desde sus primeros registros a finales del siglo XIX y principios del siglo XX a pesar de las actividades humanas que generaron impactos directos sobre la vegetación como silvicultura, minería y pastoreo de ganado.

Las técnicas de semipurificación de fitoquímicos de frutos empleando distintos solventes y las resinas de intercambio iónico (Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20) permitieron la separación de estos para su posterior identificación. El empleo de estas técnicas generó que se incrementara la concentración de compuestos con actividad biológica hasta 48 veces en fracciones extraídas de frutos de *Rubus liebmannii* y hasta 38 veces en fracciones de *Rubus palmeri*.

Utilizando equipos cromatográficos (HPLC, GC, LC-ESI-MS, MS/MS, RMN) y espectroscópicos (EAA) analizar las fracciones obtenidas de los frutos de ambas especies, así como los arreglos moleculares que las conforman. Dentro de las antocianinas se detectaron glucósidos de cianidina y una forma acilada de la misma, estando en mayor proporción la cianidina-3-O-glucósido en frutos de *Rubus liebmannii* (>80%) y cianidina-3-O-rutinósido en *Rubus palmeri*. En cuanto a taninos destacan los derivados y polímeros de casuarictina (sangüinas y lambertininas), (epi)catequinas y ácido elágico. Se encontró de igual manera la presencia de algunos carbohidratos (siendo la fructosa el principal para ambas especies) y ácidos grasos en proporciones variables de una especie a otra. De igual manera se pudo determinar la presencia de algunos minerales metálicos y no metálicos como

residuos de procesos metabólicos o implicados en reacciones de la maduración de estos. Por tanto, frutos de *Rubus liebmannii* y *Rubus palmeri* son una buena fuente de compuestos fitoquímicos diversos que, acorde a distintos estudios, cuentan con un alto potencial nutracéutico para mantener un buen estado de salud.

La capacidad antioxidante de los frutos y sus fracciones aumentó conforme se hacían purificaciones empleando las resinas de intercambio iónico. De esta manera, en ambos frutos la actividad antioxidante se incrementó hasta 19 veces, siendo las fracciones de proantocianidinas las que mostraron mayor efecto antioxidante.

La actividad antioxidante celular, determinada de manera endógena y exógena en células HepG2, nos indica que los polifenoles juegan un papel importante como agentes protectores de oxidación tanto a nivel citoplasmático como a nivel membranal.

El efecto citotóxico que muestran sobre las líneas celulares C6 y RG2 está relacionado con el comportamiento prooxidante que pueden ejercer compuestos antioxidantes como los descritos en estos frutos. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos con las distintas fracciones aisladas de frutos de ambas especies mostraron sobrevivencia y tolerancia ante la exposición a estas a diferentes concentraciones. Debido a lo anterior, las fracciones mostraron mayor efecto prooxidante sobre las líneas celulares estudiadas fueron la FRA y la FRP de *Rubus liebmannii* y la FNP de *Rubus palmeri*.

El efecto citotóxico inducido por prooxidación de estructuras celulares se pudo determinar gracias a la medición de lipoperoxidación, ROS y degradación de ADN

nuclear. Así, el mayor efecto de lipoperoxidación y de daño por genotoxicidad se observó en células RG2 a 48 horas de exposición con FRP de *Rubus liebmannii*. Por otra parte, la mayor formación de ROS sobre células C6 en tratamientos con 48 horas de exposición a la FRP de *Rubus liebmannii*.

Estos frutos presentan un alto potencial como alimentos ricos en compuestos antioxidantes, los cuales han sido asociados a estados de buena salud al prevenir cuadros clínicos de padecimientos infecciosos y no infecciosos relacionados con el estrés oxidativo.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Montoya Ó. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schlttdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*. 119:1497-1501.
- Afaq F., Saleem M., Krueger C. G., Reed J. D., Mukhtar H. 2005. Anthocyanin- and ellagic acid-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*. 113:423–433.
- Agrawal R. C. 2009. Anticarcinogenic and antimutagenic potential of *Bauhinia variegata* in Swiss albino mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 10:913-916.
- Aguilar-Contreras A., Camacho-Pulido J. R., Chino-Vargas S., Jáquez-Ríos P., López-Villafranco M. A. 1994. Plantas Medicinales del Herbario del IMSS: Su Distribución por Enfermedades. Editorial IMSS-Roche Syntex, Ciudad de México, México, 1ra Edición.
- Ahmed A. E., Jacob S., Nagy A. A. 2008. Dibromoacetone-induced protein oxidation and inhibition of proteasomal activity in rat glioma cells. *Toxicology Letters*. 179:29-33.
- Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Ávila J., Uribe-Beltrán, M. J., Díaz-Camacho S. P., López-Angula G., Veja-Aviña R., López-Valenzuela J. A., Heredia J. B., Delgado-Vargas F. 2013. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*. 49:143-149.
- Alcalde-Eon C., Escribano-Bailon M. T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C. 2004. Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 513(18):305–318.
- Aldrete J. M. 2010. Alimentos funcionales, consolidación de una tendencia. Dirección Nacional de Alimentos. 3.

- Alice L. A. y Campbell C. S. 1999. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*. 86:81-97.
- Alvídrez-Morales A., González-Martínez B., Jiménez-Salas Z. 2002. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. México. 3:2-3.
- American Cancer Society (ACS). 2015. Brain and Spinal Cord Tumors in Adults. Atlanta, Ga, USA.
- Amsellem L., Noyer J. L., Le Bourgeois T., Hossaert-Mckey M. 2000. Comparison of genetic diversity of invasive weed *Rubus alceifolius* Pior. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*. 9:443-455.
- Anand P., Kunnumakkara A. B., Sundaram C., Harikumar, K. B., Tharakan S. T., Lai O. S., Sung B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmacology Research*. 25 (9): 2097-116
- Anderson O. M. y Marham K. R. 2006. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Ratón, FL. *CRC Press/Taylor&Francis Group*. 618-748.
- Andrade-Esquivel E., Morales-Guzmán J., Ortiz-Calderón A. L., Rodríguez-García M. V., Ronquillo-Vázquez A., Mendoza-López M. R, Guzmán-Maldonado S. H., Hernández-López C. 2006. Análisis de propiedades fisicoquímicas de la zarzamora en las variedades Brazos, Cherokee y Tupy de la Zona Alta de Michoacán. 1-5.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 1999. Official Methods of Analysis 16° ed. Harla. Saint Paul, MN, EUA.
- Arts I. C., Hollman P. C., Feskens E. J., Bueno de Mesquita H. B., Kromhout, D. 2001. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: The Zutphen Elderly Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 74, 227–232.

- Asai A., Miyagi Y., Sugiyama A. 1994. Negative effect of wild-type p53 and s-myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implantation of the tumor suppressor genes for gene therapy. *Journal of Neurooncology*. 19:259-268.
- Ashewell M. 2006. ILSI Europe Concise Monograph Series. Conceptos sobre alimentos funcionales. ILSI CM. *Funcional Foods*. 2004. 7-10.
- Atkinson C. J., Nestby R., Ford Y. Y., Dodds P. A. A. 2005. Enhancing beneficial antioxidants in fruits: A plant physiological perspective. *Biofactors*. 23(4): 229–234.
- Badui S. 1999. Química de los Alimentos. Longman de México Editores. México. 648.
- Bae J., Lim S. S., Choi J., Kang Y. 2007. Protective actions of *Rubus coreanus* ethanol extract on collagenous extracellular matrix in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts. *Nutrition Research and Practice*. 1, 279–284.
- Barbosa E., Calzada F., Campos R. 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. And *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 395-397.
- Baret S., Nicolini E., Humeau L., Le Bourgeois T., Strasberg D. 2003. Use of architectural and morphometric analysis to predict the flowering pattern of invasive *Rubus* on Réunion island (Indian Ocean). *Canadian Journal of Botany*. 81:1293.
- Barsuto-García A., Silva-Adame M. B., Rico-Sánchez T., Cortés-Penagos C., García-Saucedo P. A. 2012. Bioactividad de Extractos Metanólicos de *Rubus* spp. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (Resumen Congreso) XII Encuentro Participación de la mujer en ciencia.
- Barth R. F., Kaur B. 2009. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *Journal of Neurooncology*. 94(3):299-312.

- Benda P., Lightbody J., Sato G. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*. 161:370-371.
- Bhandary B., Lee H. Y., Back H. I., Park S. H., Kim J. W., Song J. Y., Lee H. K., Kim H. R., Chae S. W., Chae H. J. 2012. Immature *Rubus coreanus* shows a free radical-scavenging affect and inhibits cholesterol synthesis and secretion in liver cells. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 211-216.
- Bloor S. J. y Abrahams S. 2002. The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 59(3):343–346.
- Bolmgren K. y Eriksson O. 2010. Seed mass and the evolution of fleshy fruits in angiosperms. *Oikos*. 119:707-718.
- Bonifaz L., Terrazas L., García F. 1992. Medida de la linfoproliferación *in vitro* por reducción de sales de tetrazolium. *Bioquimia*. 17 (68): 31–38.
- Bowen-Forbes C. S, Zhang Y., Nair M. G. 2010. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition Anales*. 23:554–560.
- Brandi G., Amagliani G., Sisti M., Fraternali D., Ninfali P., Scoccianti V. 2007. Antibacterial activity of a stable standardized in vitro culture of *Rubus ulmifolius* Schott against food-borne pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Sciences*. 19:471-476.
- Brown J. P. 1980. A review of the genetic effect of occurring flavonoids; Anthraquinones and related compounds. *Mutation Research*. 75:243-77.
- Bunea A. 2013. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*. 95:436-444.
- Burns K. T. F., Dey M., Rogers B. R., Ribnicky M. D., Gipp M. D., Cefalu T. W., Rasking I., Lila M. A. 2008. Phytomedical composition and metabolic performance-enhancing activity of dietary berries traditionally used by native North Americans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56:654-660.

- Bushman B. S., Phillips B., Isbell T., Ou B., Crane J. M., Knapp S. J. 2004. Chemical of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52(26):7982-7987
- Byamukama R., Kiremire B. T., Andersen O. M., Sterigen A. 2005. Anthocyanins form fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18, 599–605.
- Cacace J. E y Mazza G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*. 59(4):379–389.
- Cancino-Escalante G. O., Barbosa-Hernández D. S., Díaz-Carvajal C. 2012. Diversidad genética de especies silvestres y cultivadas de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. *BISTUA: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*.10:80-89.
- Caplan J. S. y Yeakley J. A. 2010. Water relations advantages for invasive *Rubus armeniacus* over two native ruderal congeners. *Plant Ecology*. 210:169-179.
- Castañeda-Ovando A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113, 859-871.
- Cermak R. y Wolfram S. 2006. The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms. *Currently Drug Metabolism*. 7(7):729–44.
- Chahar M. K., Sharma N., Dobhal M. P., Joshi Y. C. 2011 Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy*. 5(9):1-12.
- Chapman A. D. 2009. Numbers of Living Species in Australia and the World. Canberra: Australian Biological Resources Study.1–80.
- Chávez-Bárceñas A. T., Alonso-Ojeda C., García-Saucedo P. A. 2012. Proteómica de la maduración de frutos de zarzamora (*Rubus* sp.) cultivados en México, una primera aproximación. *Ra Ximhai*. 8:143-157.

- Cheng G. W y Breen J. P. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society of Horticulture Sciences*. 116:865-869.
- Cifuentes-Lemus J. L. y Gaxiola-López J. 2002. Atlas de la Biodiversidad de Sinaloa. El Colegio de Sinaloa.
- Cifuentes-Lemus J. L. y Gaxiola-López J. 2002. Atlas del Manejo y Conservación de la Biodiversidad y Ecosistemas de Sinaloa. El Colegio de Sinaloa.
- Cifuentes-Lemus J. L. y Gaxiola-López J. 2003. Atlas de los Ecosistemas de Sinaloa. El Colegio de Sinaloa.
- Colín-González A. L., Becerril H., Flores-Reyes B. R., Torres I., Pinzón E., Santamaría-Del Ángel D., Túnez I., Serratos I., Pedraza-Chaverrí J., Santamaría A., Maldonado P. D. 2015. Acute restraint stress reduces hippocampal oxidative damage and behavior in rats: Effect of S-allyl cysteine. *Life Sciences*. 135:165-172.
- Cordero C. P., Aristizábal F. A. 2003. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4(1): 100-106.
- Coutinho M. R, Quadri M. B, Moreira R. F. P. M., Quadri M. G. N. 2004. Partial purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* (red cabbage). *Separation Science and Technology*. 39(16):3769–3782.
- Cuevas-Rodríguez E. O. 2011. Evaluación del Potencial Nutracéutico de Zarzamoras Silvestres y Mejoradas-Tesis. Universidad Autónoma de Querétaro. 4, 12-15, 17, 66-72.
- Cuevas-Rodríguez E. O., Dia V. P., Yousef G. G., Garcia-Saucedo P. A. 2010. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58:9542–9548.

- Cuevas-Rodríguez E. O., Yousef G. G., García-Saucedo P. A., López-Medina J., Paredes-López O., Lila M. A. 2010. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58: 7458-7464.
- Cuevas-Rodríguez, E.O., Lila, M. A., Paredes-López, O. 2014. Antocianinas y proantocianidinas de zarzamoras silvestres mexicanas: Extracción, caracterización y bioactividad. *Publicia*. Alemania.
- Da Silva-Marineli R., Aguiar-Moraes É., Alves-Lenquiste S., Texeira-Godoy A., Nogueira-Eberlin M., Maróstica Jr. M. R. 2014. Chemical characterization and antioxidant activity of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT-Food Science Technology*. 59:1304-1310.
- Dai J., Gupte A., Gates L., Mumper R. J. 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chemical Toxicology*. 47:837-847.
- Dávalos A. 2004. Extending applicability of oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52:48-54.
- Delgado Vargas F. y Paredes-López O. 2003. Natural colorants for food and nutraceuticals. CRC Press. Boca Ratón. 1-57, 167-182.
- Denizot F. y Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunologic Methods*. 89: 271–277.
- Di Giacomo C., Acquaviva R., Santangelo R., Sorrenti V., Vanella L., Li Volti G., D’Orazio N. Vanella A., Galvano F. 2012. Effect of treatment with cyanidin-3-O- β -D-glucoside on rat ischemic/reperfusion brain damage.
- Diaconeasa Z., Leopold L., Rugina D., Ayvaz H., Socaciu C. 2015. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and

- Blackcurrant Juices. *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 2352-2365.
- Doblas S., Saunders D., Kshirsagar P. 2007. Phenyl-tret-betyl nitron induces tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. *Free Radical Biologic*. 44:63-72.
- Donner H., Gao L., Mazza G. 1997. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Research International*. 30(8):637–643.
- Dossett M., Lee J., Finn C. E. 2010. Variation in anthocyanin and total phenolics of black raspberry populations. *Journal of Functional Foods*. 2, 292–297.
- Dossett M., Lee J., Finn, C. E. 2008. Inheritance of phenological, vegetative, and fruit chemistry traits in black raspberry. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 133, 408–417.
- Dossett M., Lee J., Finn, C. E. 2011. Characterization of a novel anthocyanin profile in wild black raspberry mutants: An opportunity for studying the genetic control of pigment and color. *Journal of Functional Foods*. 3, 207–214.
- Drago-Serrano M. E., López-López M., Sainz-Espuñes T. D. R. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37:58-68.
- Ella Missang C., Guyot S., Renard C. M. G. C. 2003. Flavonols and anthocyanins of bush butter, *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam, Fruit. Changes in their composition during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(25):7475–7480.
- Erwin, T. L. 1982. Tropical Forests: Their Richness in Coleoptera and Other Arthropod Species. *The Coleopterists Bulletin*. 36 (1): 74–75.
- Estupinan D. C., Schwartz S. J., Garzon, G. A. 2011. Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and colour stability of isotonic model

- beverages coloured with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. *Journal of Food Science*. 76, S26–S34.
- Fan J., Johnson M., Lila M. A, Yousef G., González de Mejía E. 2013. Berry and citrus phenolic compounds inhibit dipeptidyl peptidase IV: Implications in diabetes management. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-13.
- FAO. 2002. Mejoramiento de la Calidad e Inocuidad de la Frutas y Hortalizas Frescas. Roma. 1:60-119.
- Farr E. R. y Zijlstra G. 1996. Index Nominum Genericorum, Smithsonian Institution.
- Fazio A. 2013. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry*. 140: 817-824.
- Focke W. O. 1894. Rosaceae. In A. Engler and K. Prantl, Die natürlichen pflanzenfamilien. *Leipzig*. 3(3):1-60.
- Focke WO. 1910. Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus. *Bibliotheca Botanica*. 17:1–120.
- Focke WO. 1911. Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus. *Bibliotheca Botanica* 17:121–223.
- Focke WO. 1914. Species Ruborum monographiae generic Rubi prodromus. *Bibliotheca Botanica* 17:1–274.
- Fossen T. y Andersen O. M. 2003. Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochemistry*. 62(8):1217–1220.
- Foster BC, Arnason JT, Briggs CJ. 2005. Natural health products and drug disposition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45:203-226.
- Futuyma, D. J., Shaffer H. B., Simberloff D. 2009. Annual review of ecology, evolution, and systematics. Palo Alto, Calif. *Annual Reviews*. 573–592.

- Garavano C. 2002. Documento Consenso: “Alimentos funcionales: Desde la ciencia hasta la definición de un marco regulatorio”. Buenos Aires: Comité de Alimentos Funcionales ILSI. Argentina. 2.
- García-Olmedo F. 2009. La biodiversidad invisible. *Revista de Libros*, 159.
- Garzon G. A., Riedi K. M., Schwartz S. J. 2009. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science*. 74, C227–C232.
- GMO. 2006 “Molecular Pharming” GMO Compass. www.GMOcompass.org
- Gomes A., Couto D., Alves A., Dias I., Freitas M., Porto G. A., Duarte J. A., Fernandes E. 2012. Trihydroxyflavones with antioxidant and anti-inflammatory efficacy. *BioFactors*. 38(5):378–386.
- Gomes C. A. 2003. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: A structure-activity study. *Journal of Medical Chemistry*. 46:5395-5401.
- González E. M., de Ancos B., Cano M. P. 2003. Relation between bioactive compounds and free radical-scavenging capacity in berry fruits during frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(7): 722–726.
- Gou P., Hu B., Gu W. 2003. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by simulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *American Journal of Pathology*. 162:1083-1093.
- Grace MH, Ribnicky DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, Raskin I, Lila MA. 2009. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*. 16:406-415.
- Grijalva J. 2007. Guía de aula de la material de Fruticultura. Sangolqui. EC. IASA. 1-5.

- Guerra M. C., Galvano F., Bonsi L., Speroni E., Costa S., Renzulli C., Cervellati R., 2005. Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (HepG2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). *British Journal of Nutrition*. 94, 211–220.
- Gutiérrez-Guzmán H. 2014. Análisis del control actual de las especies invasoras *Rubus ulmifolius* y *Aristotelia chilensis* y propuestas de mejora. GEF/MMA/PNUD.
- Haenen G. R., Paquay J. B., Korthouwer R.E., Bast A. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemistry Biophysics Research Communication*. 236:591–593.
- Harborne J. B. y Hall E. 1964. Plant polyphenols-XIII. The systematic distribution and origin of anthocyanins containing branched trisaccharides. *Phytochemistry*. 3, 453–463.
- Harborne J. B. y Williams C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- Harborne, J.B. y Self R. 1987. Malonated 151olor151uat 3-glucosides in Zea mays and other grasses. *Phytochemistry*. 26, 2417-2418.
- Harrison. 2006. Tumores cerebrales 151olor151uat. Principios de Medicina Interna 16ª edición. McGraw-Hill.
- Hawkesford M., Horst W., Kichey T., Lambers H., Schjoerring J., Møller I. S., White P. 2002. Functions of Macronutrients. In: Marschner, P. (Ed.). Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. San Diego: Academic Press. Chap. 6: 135-189.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry*. 13:572-584.
- Heimberger A. B., Suki D., Yang D. 2005. The natural history of EGFRvIII in glioblastoma patients. *Journal of Translation Medical*. 3:38.

- Herschman P. S., Lightbody H. R. J. 1970. Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system. *Journal of Cellular Physiology*. 75:329-339.
- Hirano T., Oka K., Akiba M. 1989. Antiproliferative effect of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumour cells of human carcinoma cells lines. *Research of the Community of Chemistry, Pathology Pharmacology*. 64:69-78.
- Hong V. y Wrolstad R. E. 1990. Characterization of anthocyanin – contain colourants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 698–708.
- Howell A. B. 2002. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Food Science of Nutrition*. 42:273–278.
- Hummer E. K. 1996. *Rubus* diversity. *Horticulture Science*. 31(2):182–183.
- Jackman R. L., Yada R. Y., Tung M. A., Speers R. A. 1987. Anthocyanins as food colorants- a review-. *Journal of Food Biochemistry*. 11:201, 270.
- Jakobek L., Seruga M., Seruga B., Novak I., Medvidovic-Kosanovic M. 2009. Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*. 44, 860–868.
- Johnson J. L., Bomser J. A., Scheerens J. C., Giusti M. M. 2011. Effect of black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) extract variation conditioned by cultivar, production site, and fruit maturity stage on colon cancer cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 1638–1645.
- Johnson M. 2013. Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry–blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes *in vitro*. *Molecular Nutrition and Food Research*. 57:1182-1197.

- Jones P. J. 2002. Clinical nutrition: 7. Functional foods more than just nutrition. *Canadian Medical Association Journal*. 166(12):1555-1563.
- Jurd L. 1972. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Advances Food Research*. 3:123-142.
- Kader A., Zagory D., Kerbel E. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Review of Food Science Nutrition*. 28(1):1–30.
- Kader A. A. 2008. Perspective flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88(11): 1863-1868.
- Kahkonen M. P, Hopia A. I. y Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8):4076–4082.
- Kapasakalidis P. G, Rastall R. A., Gordon M. H. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(11):4016–4021.
- Katsube N., Keiko I., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:68-75.
- Kawsar S. M. A., Huq E., Nahar N., Ozeki Y. 2008. Identification and quantification of phenolic acids in *Macrotyloma uniflorum* by reversed phase HPLC. *American Journal of Plant Physiology*. 3:165-172.
- Kerry N. L. y Abbey M. 1997. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis*. 35:93-102.
- Kool M. M., Comeskey D. J., Cooney J. M., McGhie T. K. 2010. Structural identification of the main ellagitannins of a boysenberry (*Rubus loganbaccus* x *baileyanus* Britt.) extract by LC-ESI-MS/MS, MALDI-TOF-MS and NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. 119:1535-1543.

- Kong J., Chia L., Goh N., Chia T., Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64:923-933.
- Kozłowska A. y Szostak-Węgierek D. 2014. Flavonoids-Food Sources and Health Benefits. *Rocz Panstw Zakł Hig*. 65(2): 79-85.
- Kral T., Widerak K., Langner M., Hof M. 2005. Propidium iodide and PicoGreen as dyes for DNA fluorescence correlation spectroscopy measurements. *Journal of Fluorescence*. 15(2): 179-183.
- Krifi B, Chouteau F, Boudrant J, Metche M. 2000. Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *International Journal of Food Science and Technology*. 35:275-283.
- Ku C. S. y Mun S. P. 2008. Optimization of the extraction of anthocyanin from bokbunja (*Rubus coreanus* Miq) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. *Bioresource Technology*. 99, 8325–8330.
- Lee J., Dossett M., Finn C. E. 2012. *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*. 130:785-796.
- Li Y., Ambrosone C. B., McCullough M. J., Ahn J., Stevens V. L., Thun M. J., Hong C. C. 2009. Oxidative stress related genotypes, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 30:777-784.
- Ling Y., Ren C., Mallery S. R., Ugalde C. M., Pei P., Saradhi U. V. R. V. 2009. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of four anthocyanins and its application in a clinical pharmacology study of a bioadhesive black raspberry gel. *Journal Chromatography*. 877, 4027–4034.
- Liu J., Zhang W., Jing H., Popovich D. G. 2010. Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured HepG2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability. *Journal of Food Science*. 75:103–H07.

- Liu R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal Clinical Nutrition*. 78(5):17S–20S.
- Maatta-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Torronen A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 6178–6187.
- Maccarone E., Maccarone Z., Popovic M., Miladinovic J. 2009. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*. 99:6688-6691.
- Macready A. L., Kennedy O. B., Ellis J. A., Williams C. M., Spencer J. P. E., Butler L. T. 2009. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutrition*. 4:227-242
- Majewska M. y Czczot H. 2009. Flavonoids in prevention and therapy diseases. *Ter Lek*. 65(5):369-377.
- Majewski G., Lubecka-Pietruszewska K., Kaufman-Szymczak A., Fabianowska-Majewska K. 2012. Anticarcinogenic capabilities of plant polyphenols: flavonoids and stilbene. *Journal of Public Health*. 122(4):434-439.
- Malavolta E., Gomes F. P., Alcarde J. C. 2002. Adubos e adubações. São Paulo; Nobel.
- Malavolta E., Vitti G. O., Oliveira S. A. 1997. Avaliações do estado nutricional das plantas: 155olor155uati e aplicações. *Piracicaba: Potafós*.
- Małolepsza U. y Urbanek H. 2000. Plant flavonoids as biochemical active compounds. *Wild Botany*. 44(3/4):27-37
- Manach C. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.

- Manach E., Williamson G., Morand C., Seal A., Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81:230S-242S.
- Manning K. 1998. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*. 205:622–631.
- Mannino S., Molinari A., Sabatino. 2008. Intratumoral vs systematic administration of metatetrahydroxyphenylchlorin for photodynamic therapy of malignant gliomas: assessment of uptake and spatial distribution in C6 rat glioma model. *International Journal of Immunopathology Pharmacology*. 21:227-231.
- Markakis P. 1974. Anthocyanins and their stability in food. *Critical Review Food Technology*. 4:437-456.
- Martin R. R., Macfarlane S., Sabanadsovic S., Quito D., Poudel B., Tzanetakis I. E. 2013. Viruses and Virus Diseases of *Rubus*. *Plant Disease*. 97(2): 168-182.
- Martín del Campo J. S., Rollin J., Myung S., Chun Y., Chandrayan S., Patiño R., Adams M. W., Zhang Y.-H. P. 2013. High-Yield Production of Dihydrogen from Xylose by Using a Synthetic Enzyme Cascade in a Cell-Free System. *Angewandte Chemie International Edition*. **52** (17): 4587.
- Martínez-Cruz N. S., Arévalo-Niño K., Verde-Star M. J., Oranday-Cárdenas A., Rivas-Morales C., Treviño-Neávez J., Morales-Rubio M. E. 2013. Germinación *in vitro* e inducción de callo en *Rubus adenotricus* Schldl. *Polibotánica*. 35:99-107.
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J., Tuñón M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17:271-278.
- Mateus N., Silva A. M. S., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C., de Freitas V. 2003. A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5(17):1919–1923.

- Mattila P. y Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived food by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50:3660-3667.
- Mauseth J. D. 2003. Botany and Introduction to Plant Biology. Third Edition. Chapter 23. Vascular Plant without seeds. 682-720.
- Mazza C. 2001. Obesidad en pediatría: Panorama Actual. SAOTA, *Obesidad*. 12(1):28-30.
- Mendelsohn R., Balick M. J. 1995. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany*. 49 (2): 223–228.
- Merken H. M. y 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.
- Mertz C., Cheynier V., Günata Z., Brat P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55:8616-8624.
- Milner J. A. 2004. Molecular targets for bioactive food components. *Journal of Nutrition*. 134(9):2492-2498.
- Morden C. W., Gardener D. E. y Weniger D. A. 2003. Phylogeny and biogeography of Pacific *Rubus* subgenus *idaeobatus* (Rosaceae) species: investigating the origin of the endemic Hawaiian raspberry *R. macraei*. *Pacific Science*. 57:181-197.
- Morford L. A., Boghaert E. R., Brooks W. H. 1997. Insulin-like growth factor (IGF) enhance three-dimensional (3D) growth of human glioblastomas. *Cancer Letters*. 115:81-90.

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunologic Methods*. 65: 55–63.
- Moure A. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72: 145-171.
- Moyer R. A., Hummer K. E., Finn C. E., Frei B., Wrolstad R. E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50:519–525.
- Nagle D. G., Ferreira D. Zhou Y.D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*. 67(17):1849-1855.
- Nandakumar V., Sing T., Katuyar K. S. 2008. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. Mini-review. *Cancer Letters*. 269:378-387.
- Netzel M., Netzel G., Tian Q., Schwartz S., Konczak I. 2006. Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. Identification and quantification of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 9820–9826.
- Nijveldt R. J., van Hoorn D. E. C., van Nood E., Boelens P. G., van Norren K., van Leewen P. A. M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. 74:418-425.
- Nurmi K. I., Ossipov V., Haukioja E., Kalevi P. 1996. Phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birches trees (*Betula pubescens* spp. Tortuosa). *Journal Chemistry of Ecology*. 22:2013-2040.
- Olejnik A., Tomczyk J., Kowalska K., Grajek W. 2010. The role of natural dietary compounds in colorectal cancer chemoprevention. *Postępy Hig Med Dosw*. 64:175-187.
- Osawa T. 1999. Protective role of rice polyphenols in oxidative stress. *Anticancer Research*. 19:3645-3650.

- Osseni R. A., Debbasch C., Christen M. O., Rat P., Warnet J. M. 1999. Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: the role of anethole dithiolethione as a scavenger. *Toxicology in vitro*. 13 (4-5): 683-688.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10):4619–4626.
- Paudel L., Wyzgoski F., Giusti M. M., Johnson J. L., Rinaldi P. L., Scheerens J. C., Chanon A. M., Bomser J. A., Miller A. R., Hardy J. K., Reese R. N. 2014. NMR-Based Metabolomic Investigation of Bioactivity of Chemical Constituents in Black Raspberry (*Rubus occidentalis* L.) Fruit Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62:1989-1998.
- Paudel L., Wyzgoski F., Scheerens J. C., Chanon A. M., Reese R. N., Smiljanic D., Wesdemiotis C., Blakeslee J. J., Riedl K. M., Rinaldi P. L. 2013. Nonanthocyanin Secondary Metabolites of Blackberry (*Rubus occidentalis* L.) Fruits: Identification by HPLC-DAD, NMR, HPLC-ESI-MS, and ESI-MS/MS Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:12032-12043.
- Peterson J. J., Dwyer J. T., Jacques P. F., McCullough M. L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*. 70(9), 491–508.
- Pollastri S., Tattini M. 2011. Flavonols: old compounds for old roles. *Annual Botany*. 108:1225-1233.
- Prasain J. K., Carlson S. H., Wyss J. M. 2010 Flavonoids and Age Related Disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas*. 66(2):163-171.
- Prior R. L. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:3273-3279.
- Pullin A. 2002. Conservation Biology. Cambridge: Cambridge University Press.

- Puupponen-Pimiä R., Aura A. M., Karppinen S., Oksman-Caldentey K. M., Poutanen K. 2004. Interactions between plant bioactive food ingredients and intestinal flora-effects on human health. *Bioscience of Microflora*. 23 :67-80.
- Ramírez R., Vargas P. O., Arreola H., Cedano M., González R., González-Villarreal L.M., Harker M., Hernández I., Martínez R.E., Pérez de la Rosa J., Rodríguez A., Reynoso J., Villarreal de Puga L.M., Villaseñor J. L. 2010. Catálogo de plantas vasculares de Jalisco. Universidad de Guadalajara. *Sociedad Botánica de México*. Universidad Autónoma Metropolitana. 143.
- Ratty A. K. y Das N. P. 1988. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemistry of Medical Metabolism Biologic*. 39:69-79.
- Remberg S. F., Sonstebj A., Aaby K., Heide O. M. 2010. Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of Glen Ample raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 9120–9128.
- Remy-Tanneau S., Le Guernevea C., Meudec E., Cheynier V. 2003. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(12), 3592–3597.
- Reyes-Carmona J. 2005. Antioxidant Capacity of Fruit Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. *Sensory and Nutritive Qualities of Food*. 70: 497-503.
- Robbins R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 2866–2887.
- Roberfroid M. B. 1999. Concepts in Functional foods: the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*. 129(7): 1398S-1401S.

- Rodriguez-Saona L., Giusti M., Wrolstad R. 1999. Color and pigment stability of red radish and red fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*. 64, 451-456.
- Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F. F., Cimato A. 1999. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(3), 964–967.
- Romero V. S. 2008. Actividad Antiprotozoaria de los Productos Derivados de las Partes Aéreas de *Rubus liebmannii* Focke, Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México City, México, 2008.
- Rydberg P. A. 1913. *North American Flora* 22(5): 456
- Rzedowski J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot t J.Fa (eds.) *Diversidad biológica de México: orígenes y su distribución*. IBUNAM, México, pp. 129-145.
- Rzedowski J. y Rzedowski G. 1981. *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Editorial Continental, México City, México, 1st edition.
- Sangiovannii E., Vrhovsek U., Rossoni G., Colombo E., Brunelli C., Brembati L., Trivulzio S., Gasperotti M., Mattivi F., Bosisio E., Dell’Agli M. 2013. Ellagitannins from *Rubus* berries for the control of gastric inflammation: *in vitro* and *in vivo* studies. *Plus One*. 8, 1-13.
- Santos-Guedes M. N., Patto-de Abreu C. M., Castilho-Maró L. A., Pio R., de Abreu J. R., de Oliveira J. O. 2013. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 35(2): 191.196.
- Schantz M., Mohn C., Baum M., Richling E. 2010. Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. *Journal of Berry Research*. 1:25–33.
- Schlechtendal D. L. F. 1839. *Rubus*. In: *De plantis mexicanis a G. Schiede, M. Dr., Car. Ehrenbergio aliisque collectis (161olor161uation)*. *Linnaea* 13: 266–271.
- Schlegel J., Piontek G., Kersting M. 1999. The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology*. 67:202-206.

- Schmidek H. H., Nielsen S. L., Schiller A. L. 1971. Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosometilurea. *Journal of Neurosurgery*. 34:335-340.
- Schnitzler J.P., Jungblut T.P., Feicht C., Ko€erlein M., Langobartek C., Heller W., Sandermann H., 1996. UV-B screening pigments and chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist*. 132, 247-258.
- Schwarz M., Wabnitz T. C., Winterhalter P. 2003. Pathway leading to the formation of anthocyanin–vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(12):3682–3687.
- Seeram P. N. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:627–629.
- Sheehan J., Ionescu A., Pouratian N. 2008. Use of trans sodium crocetin for sensitizing glioblastoma multiforme to radiation: laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery*. 108:972-978.
- Shirley B. W. 1996. Flavonoid biosynthesis: ‘new’ functions for an ‘old’ pathway. *Trends Plant Science*. 1:377-382.
- Si D., Wang Y., Zhou Y. H. 2009. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metabolism*. 37(3):629–34.
- Siriwoharn T. y Wrolstad R. E. 2004. Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *Journal of Food Science*. 69(4):233–240.
- Solly F., Fish R., Simard B. 2008. Tissue-type plasminogen activator has antiangiogenic properties without effect on tumor growth in a rat C6 model. *Cancer Gene*. 15:685-692.
- Sonoda K. 2013. Anthocyanin-rich *Aronia melanocarpa* extract improves body temperature maintenance in healthy women with a cold constitution. *SpringerPlus*. 2:626-631.

- Sosa V. 1995. Recuento de la diversidad florística de Veracruz. División de Vegetación y Flora. Instituto de Ecología A. C. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto No. P011. México, D.F.
- Stack R. J. 2010. Microbial production of L-altrose. Government of the United States of America, Secretary of Agriculture.
- Stoner G. D., Sardo C., Apseloff G. A., Mullet D., Wargo W., Pound V. 2005. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *Journal of Clinical Pharmacology*. 45, 1153–1164.
- Sudheer K. P., Indira V. 2007. Postharvest technology of horticultural crops. *Horticulture Science Series*. 7(1): 17-31.
- Sunehag A. L., Louie K., Bier J. L., Tigas S., Haymond M. W. 2002. Hexoneogenesis in the human breast during lactation. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. **87** (1): 297–301.
- Tanriover N., Ulu M. O., Sanus G. Z. 2008. The effects of systematic and intratumoral interleukin-12 treatment in C6 rat glioma model. *Neurological Research*. 30:511-517.
- Toledo V. M. 1994. La diversidad biológica de México: nuestros retos para la investigación en los noventas. Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 34:43-59.
- Tomczyk P. y Gudej J. 2005. Polyphenolic compounds from *Rubus saxatilis*. *Chemical National Compounds*. 41:349-351.
- USDA NNDB. Available: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2180>
- Vasco C., Riihinen K., Ruales, Kemal-Eldin, A. 2009. Phenolic compounds in Rosaceae fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1204–1212.

- Vauzour D., Vafeiadou K., Rodrigues-Mateos A., Rendeiro C., Spencer J. P. E. 2008. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutrition*. 3:115-126.
- Velišek J., Davidek J., Cejpek K. 2008: Biosynthesis of food constituents: Natural pigments. Part 2– a review. *Czech Journal of Food Science*. 26:73–98.
- Villaseñor J.L., Ortiz E., Redonda-Martínez R., Gual M. 2010. Nomenclator taxonómico de las especies del Bosque Húmedo de Montaña en México. Base de datos CONABIO.
- Vrhovsek U., Guella G., Gasperotti M., Pojer E., Zancato M., Mattivi F. 2012. Clarifying the Identity of the main Ellagitannins in the Fruit of the Strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 2507-2516.
- Vivar-Quintana A. M., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C. 2002. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*. 458(1):147–155.
- Wang H., Cao G., Prior R. L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 701–705.
- Wang S. Y., Bowman L., Ding M. 2008. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*. 107: 1261-1269.
- Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. 126:485-493.
- Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E., Prior R. L., 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4069–4075.
- Wyzgoski F. J., Paudel L., Rinaldi P. L., Reese R. N., Ozgen M., Tulio A. Z. Jr. 2010. Modeling relationship among active components in black raspberry (*Rubus*

- occidentalis* L.) fruit extracts using high-resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 3407–3414.
- Xiang Z., Cai K., Geng Z., Zhang J., Zhou S. 2013. Simultaneous extraction and derivatization of volatile organic acids in flue-cured tobacco with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS. *Analytical Letters*. 46: 640-650.
- Yamakoshi J., Siato M., Kataoka S., Kikuchi M. 2002. Safety evaluation of proanthocyanidins-rich extract from grape seeds. *Food Chemistry Toxicology*. 40:599-607.
- Yang W. Q., Lun X., Palmer C. A. 2004. Efficacy and safety evaluation of human reovirus type 3 in immunocompetent animals: racine and nonhuman primates. *Clinical Cancer Research*. 10:8561-8576.
- Youdim K. A. y Joseph J.A. 2001. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biological Medicine*. 30:583–594.
- Zalega J. y Szostak-Węgierek D. 2013. Nutrition in cancer prevention. Part I. Plant polyphenols, carotenoids, dietary fiber. *Probl High Epidemiology*. 94:41-49.
- Zaro M. J. 2014. Análisis de factores que afectan la acumulación, distribución y estabilidad de antioxidantes de naturaleza fenólica en berenjena (*Solanum melongena* L.). 208.
- Zhan S., Zhang X., Zhang J. 2008. Intravenous administration of arsenic trioxide encapsulated in liposomes inhibits the growth of C6 gliomas in rat brains. *Journal of Chemotherapy*. 20:253-262.

X. ABREVIATURAS

AAC	Actividad Antioxidante Celular
Aac	Ácido acético
AAPH	2-2'-Azobis amidinopropano
ACS	American Cancer Society (Sociedad Estadounidense de Cáncer)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AET	Acetato de etilo
AFM	Ácido fórmico

AOAC	Association of analytical communities
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
AUC	Area under the curve (Área bajo la curva)
Aw	Clima tropical con invierno seco
Bs	Base seca
BSTFA	<i>N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetoamida</i>
BW	Clima seco árido
C	Control
Ca	Calcio
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDD	Comportamiento dosis dependiente
Cm	Centímetro(s)
col	Colaboradores
CONABIO	Comisión Nacional de Uso y Conocimiento de la Biodiversidad
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
CV	Comportamiento variable
C ₃ H ₃ O ₃ Na	Piruvato de sodio
DFC	Duclorofluoresceína oxidada
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DMEM	Dubelcco's modified Medium (Medio Eagle de Dubelcco Modificado)
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Este
EAA	Espectroscopía de absorción atómica
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Extracto crudo
ECD	Enfermedades crónico-degenerativas
EC ₅₀	Concentración de extractos requerida para alcanzar un 50% de actividad antioxidante celular
ENU	<i>N</i> -etil- <i>N</i> -nitrosourea
ESI	Electrospray ionization (Ionización por electrospray)
Esp	Especie
ET	Equivalentes de trólox
EtOH	Etanol
Ev	Electrovoltios
F-C	Folin-Ciocalteau
FCHO	Fracción de carbohidratos
Fe	Hierro
ff	Fruto fresco
FNP	Fracción no polar
FP	Fracción rica en polifenoles
FRA	Fracción rica en antocianinas

FRP	Fracción rica en proantocianidinas
g	Gramo(s)
CG	Gas cromathography (Cromatografía de gases)
h	Hora(s)
HBSS	Medio de cultivo de Hank
HCl	Ácido clorhídrico
HN	Herbario Nacional
HNO ₃	Ácido trioxinítrico
HPLC	High performance liquid cromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
Hz	Hertz
H ₂ O	Agua
IBUNAM	Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México
INC	Instituto Nacional de Cancerología
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Potasio
kg	Kilogramo(s)
km	Kilómetro(s)
Kv	Kilovoltios
L	Litro(s)
LC	Liquid cromatography (Cromatografía líquida)

m	Metro(s)
MHz	Megahertz
Mm	Milimolar
mm	Milímetro
MeOH	Metanol
Mg	Magnesio
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
Mn	Manganeso
MS	Espectrometría de masas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa/carga
N	Norte/Nitrógeno/Normal
Na	Sodio
NaOH ₂	Bicarbonato de sodio
ND	No Disponible
NE	Noreste
nm	Nanómetro(s)
NO	Noroeste/Óxido nítrico
O	Oeste
OH	Grupo hidroxilo

ORAC	Oxygen radical absorvance capacity (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
O ₂	Oxígeno Molecular
P	Fósforo
p	Peso
PBS	Phosphate-buffered saline (Buffer de fosfato salino)
PFA	Paraformaldehído
Ph	Coefficiente de acidez y alcalinidad
ppm	Partes por millón
PROFAPI	Programa de Fortalecimiento a Proyectos de Investigación
PTFE	Politetrafluoretileno
RMCD	Random metiled cyclodextrin (Ciclodextrina metilada al azar)
RNM ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protones
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Tiempo de retención
S	Sur
s	Segundo(s)
SE	Sureste
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SFB	Suero fetal bovino

SMC	Sistema Nervioso Central
SO	Suroeste
TBE	Buffer de tris, borato y EDTA.
TPL	The Plant List
U	Unidades
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)
UAS	Universidad Autónoma de Sinaloa
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
v	Volumen
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
WME	William's Medium Eagle (Medio Eagle de William)
Zn	Zinc
µg	Microgramo(s)
µL	Microlitro(s)
µmol	Micromol(es)
δ	Partes por millón
°C	Grados centígrados

