



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA

“PRESIDENTE JUÁREZ”

EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE PLANTAS SILVESTRES DE ZARZAMORA (*Rubus* spp.) PARA APLICACIONES ANTIMICROBIANAS

TESIS

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Que como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

I.B.Q. MARÍA BLANCA SILVA ADAME

Director de tesis:

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO

Codirectora de tesis:

Doctora en Ciencias en Biotecnología de Plantas

ZULMA ISABEL MONSALVE FONNEGRA

Uruapan, Michoacán, agosto de 2014



Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Bromatología e Interacciones Planta Ambiente de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Pedro Antonio García Saucedo, y en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Unidad Irapuato, bajo la asesoría del Dr. Víctor Olalde Portugal.

DEDICATORIA

A mis padres, Gustavo y Dolores, mis hermanos, Beto y Lolis,
al pequeño Diego y mi tía Tita, a ustedes que son los invaluabletes tesoros que la
vida me otorgó; ejemplo, inspiración, mis apoyos constantes, mis eternos
acompañantes en el viaje de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para estudios de posgrado.

A mis padres y hermanos, que no sólo siempre han sido comprensivos con las decisiones que tomo y el camino que decido seguir sino que siempre apoyan cada paso, correcto o equivocado; porque son las personas más nobles y amorosas, que entregan todo para que juntos salgamos adelante, particularmente para que yo logre mis metas y sueños. Gracias por todo su amor, entrega y comprensión para que yo viva la maravillosa vida que me han ayudado a construir con su ejemplo e incesante trabajo. Son mi gran admiración y ejemplo. Los adoro con todo mi corazón.

A mi tía Tita, Maestra Ma. Bertha Silva L., porque siempre te he llevado a mi lado desde pequeña como una segunda mamá para todos; ejemplo de vida, la líder de una familia y modelo de compromiso con su profesión, de integridad y honestidad. Eres un pilar en mi vida, inspiración y ejemplo. Te quiero mucho, tía.

A Laura Viridiana Pedraza Arriola, mujer que desempeña tantos papeles en mi vida como compañera, colega, alumna pero principalmente como una gran amiga. Gracias por acompañarme en todos los altibajos de esta etapa, tu entrega, compromiso y gran apoyo para la realización de este trabajo que se convirtió en un proyecto de las dos.

A mi asesor, Dr. Pedro Antonio García Saucedo, en primera instancia por darme esta valiosa oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y establecer este proyecto bajo su asesoría. Gracias por confiar en mí, en mi trabajo y guiarme en mi desarrollo profesional, por promover la exigencia académica en sus alumnos y una formación integral de sus estudiantes.

A mis sinodales, Dr. Víctor Olalde Portugal, M.C. Atahualpa Guzmán de Casa, Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas y Dr. Edgardo Federico Hernández Valdés, por su apoyo en la realización y revisión de este trabajo desde el inicio, así como por sus atinados comentarios y observaciones que enriquecieron.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal, por brindarme la oportunidad de participar en su equipo de trabajo, compartir sus experiencias de vida, compartir su conocimiento con toda sencillez y su constante apoyo.

Al M.C. Atahualpa Guzmán de Casa, quien siempre tuvo la disponibilidad de compartir su conocimiento y experiencias, enriqueciendo este trabajo y mi formación haciendo observaciones y comentarios que en numerosas ocasiones fueron la pauta para hacer cambios pertinentes. Gracias por su apoyo como profesor y compañero de trabajo.

A la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas, por sus atinadas aportaciones durante el desarrollo de este proyecto, por permitirme participar en su equipo de trabajo y las actividades académicas que enriquecieron mi formación, así como por darme la oportunidad de trabajar en las instalaciones del laboratorio que coordina, teniendo acceso a todo lo que requiriera.

A S. Enrique Bucio Cortés, Diana Janette García Bucio, Rosa María y Karla Arredondo Ramírez, mis leales amigos que a pesar de los años, distancia, distintos rumbos en la vida y profesiones, se han encargado de mantenerme cerca de sus vidas apoyando y compartiendo cada etapa de mi vida.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Andrés González y Alexánder Basurto, por su invaluable apoyo y amistad, alegrarme cuando perdía el buen ánimo, acompañarme, trabajar conmigo, y ayudarme a que este trabajo llegara a su culminación. Gracias por la “mini familia” que formamos y el apoyo incondicional que siempre me brindaron.

A mis compañeros de los laboratorios de Bromatología e Interacciones Planta-Ambiente de la Facultad de Agrobiología: Lau, Alex, Andrés “El grandote”, Flor, Susy, Luisa, Alonso, Andrés Romero, Tafo, Isaac, Susy, Ángel, Chuy, etc., que compartimos momentos de trabajo, estudio, discusiones académicas pero también de mucha diversión y risas.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV-Irapuato: Isa, Horacio, Hugo, Oralia, Chayito, Fanny, Angie, Paty, Laura, Mago, Mine, Kevin, Chuy Chuy y las colombianas Diana y Karen, siempre manteniendo un ambiente positivo que aligeraba el trabajo y las dificultades. Gracias por compartir sus conocimientos y ayudarme tanto en el desarrollo de mi propio trabajo.

Al pequeño que más adoro, mi sobrino Diego "Chip"; aún sin hablar y sin saber decir mi nombre, tus ojitos y sonrisa me motivan a dar lo mejor. Sabes alegrarme y cambiarme el día en el momento en que te veo y me abrazas, porque eres mi motor de superación; me propongo alcanzar mis metas y seguir soñando para un día compartir mis recuerdos y experiencias contigo.

A mis tíos, primas, amigos y demás personas que me apoyaron tanto en el ámbito profesional como en lo personal.

¡GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE GENERAL

Índice de Cuadros.....	i
Índice de Figuras	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 ZARZAMORA.....	2
2.1.1. Generalidades del género <i>Rubus</i>	2
2.1.2. Descripción botánica	3
2.1.3. Clasificación taxonómica	4
2.1.4. Importancia	4
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	9
2.2.1. Alcaloides	15
2.2.2. Terpenoides.....	18
2.2.3. Polifenoles	21
2.2.4. Biopesticidas.....	49
2.3. Bacterias fitopatógenas.....	50
2.3.1. <i>Pantoea stewartii</i>	50
III. JUSTIFICACIÓN.....	51
IV. OBJETIVOS.....	51
4.1. Objetivo general.....	51
4.2. Objetivos específicos.....	51
V. HIPÓTESIS.....	52
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	52
6.1 MATERIALES	52
6.1.1. Colecta de materiales silvestres.....	52
6.1.2. Material microbiológico	52
6.2. MÉTODOS.....	52
6.2.1. Preparación del material vegetal para extracción de compuestos.....	52
6.2.2. Obtención de extractos crudos (EC)	53
6.2.3. Cuantificación de compuestos polifenólicos.....	54
6.2.4. Bioensayos de actividad antimicrobiana.....	55
6.2.5. Fraccionamiento del extracto tallo <i>Rubus adenotrichos</i> en cromatografía en columna empacada (CCE)	58

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
7.1. Identificación y descripción de especies silvestres de zarzamora	60
7.2. Estandarización de una técnica de extracción de polifenoles	63
7.3. Bioensayos de actividad antimicrobiana	73
7.3.1. Estandarización del inóculo.....	73
7.3.2. Inhibición del crecimiento de <i>Pantoea stewartii</i>	74
VIII. CONCLUSIONES.....	79
IX. PROSPECTIVAS.....	80
X. REFERENCIAS CONSULTADAS.....	80

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Comparación del contenido nutrimental de frutilla.....	6
Cuadro 2. Clases principales de alcaloides, aminoácido precursor e intermediario central del cual derivan.....	15
Cuadro 3. Ejemplos de compuestos flavonoides, fuente alimenticia y sus efectos biológicos	43
Cuadro 4. Estructura química de algunas clases de polifenoles y microorganismos sensibles a ellos	46
Cuadro 5. Protocolos para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu	48
Cuadro 6. Descripción de los tratamientos y controles establecidos en la evaluación de actividad antimicrobiana.....	56

Índice de Figuras

Figura 1. Tendencia de consumo nacional aparente (TMCA) expresado en el porcentaje de importaciones y exportaciones México-Estados Unidos	5
Figura 2. Funciones de los metabolitos secundarios en las plantas	13
Figura 3. Utilización de los metabolitos secundarios en biotecnología.....	15
Figura 4. Alcaloides del tipo isoquinolina.....	17
Figura 5. Ruta del ácido mevalónico (HMG: 3-hidroxi-3-metilglutarilo; IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil difosfato).....	19
Figura 6. Ejemplos de estructuras terpenoides y su función.....	21
Figura 7. a) Derivados del ácido cinámico, b) derivados del ácido benzoico.....	22
Figura 8. Síntesis de fenilpropanoides simples (ácidos cinámicos) a partir del ácido shikímico	23
Figura 9. Formación de ácidos cinámicos a partir de aminoácidos aromáticos.....	24
Figura 10. Estructura química del ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquínico)	24
Figura 11. Estructura genérica de una molécula flavonoide (Balasundram et al., 2006)	26
Figura 12. Estructura química de los principales grupos/subgrupos flavonoides y sus glicósidos asociados (Huang et al., 2010).....	27
Figura 13. Ejemplo de la estructura química de un isoflavonoide	28
Figura 14. Estructura química de una aurona	28
Figura 15. Estructura general de las antocianinas y ejemplos de ellas (Bowsher et al. 2008)	29
Figura 16. Síntesis de estilbenos a partir de los precursores de flavonoides.....	30
Figura 17. lignano	
Figura 18. Estructura de un tanino hidrolizable (Taiz y Zeiger, 2006)	32
Figura 19. Estructura de un tanino condensado (Taiz y Zeiger, 2006).....	33
Figura 20. Esquema general de rutas implicadas en la producción de los compuestos fenólicos principales en plantas (Bowsher et al., 2008)	34
Figura 21. Biosíntesis de chalcona a partir de fanilalanina (Bowsher et al., 2008)	35
Figura 22. Estructura química del A) Resorcinol, B) Floroglucinol.....	36
Figura 23. Estructura química del A) Catecol, B) Pirogalol	36
Figura 24. Algunos compuestos representativos derivados de ácido shikímico.....	37
Figura 25. Representación esquemática de la biosíntesis del ácido shikímico y transformación al precursor de la fenilalanina, ácido fenilpirúvico	38
Figura 26a. Ruta del ácido shikímico, parte 1.....	39
Figura 27. Rutas y ramificaciones en la biosíntesis de los principales grupos de flavonoides. (CHS/CHR, chalcona sintasa/chalcona reductasa; ACC, acetil CoA carboxilasa; STS, estilbeno sintasa).....	41
Figura 28. Preparación de material vegetal para extracción de compuestos: A) Deshidratador, B) Hojas distribuidas de manera uniforme en los platos del deshidratador, C) Pulverización, D) Reducción de tamaño de los tallos	53
Figura 29. Extracción sucesiva de compuestos por cambio de polaridad de solvente: A) Equipo Soxhlet completamente montado, B) Dedal de celulosa con muestra en su interior, C) Ebullición continua de solvente, D) Extracto final	54

Figura 30. Métodos de diluciones seriales y siembra en placa (tomado de Brock Biología de los Microorganismos).....	57
Figura 31. Método de siembra en placa	58
Figura 32. Rubus adenotrichos A) Tallo, B) Hoja y C) Flor	60
Figura 33. Tallos de Rubus adenotrichos vistos directamente y bajo estereoscopio.....	61
Figura 34. Rubus coriifolius, A) Tallo, B) Hoja y C) Flor	61
Figura 35. Tallos de Rubus coriifolius vistos directamente y bajo estereoscopio.....	62
Figura 36. Morfoespecie “Cerosa”, A) Tallo y B) Hoja.....	62
Figura 37. Tallos de la morfoespecie “Cerosa” vistos directamente y bajo estereoscopio ..	63
Figura 38. Efecto del tiempo sobre el contenido de polifenoles totales en extractos etanólicos de hoja de R. coriifolius y R. adenotricho. Literales distintas denotan diferencias significativas entre tratamientos comparando ambas especies, Tukey-Kramer ($p \geq 0.05$) ..	66
Figura 39. Efecto del tiempo y solvente sobre el contenido de polifenoles totales en extractos metanólicos de hoja de R. coriifolius y R. adenotrichos obtenidos por el método de maceración.....	68
Figura 40. Cinética de crecimiento de <i>Pantoea stewartii</i> y predicción de acuerdo al modelo Verhults-Pearl	73
Figura 41. Curva normalizada de crecimiento de <i>Pantoea stewartii</i>	74
Figura 42. Efecto sobre el porcentaje de inhibición de <i>Pantoea stewartii</i> como respuesta al tipo extracto de hojas de la especie Rubus adenotrichos.....	75
Figura 43. Porcentaje de inhibición de <i>Pantoea stewartii</i> en respuesta a distintos extractos de hoja de Rubus adenotrichos. HR.a5= hoja Rubus adenotrichos 5 días de maceración, HR.a10= hoja Rubus adenotrichos 10 días de maceración, Sox=hoja Rubus adenotrichos en extracción Soxhlet, 1-3=Repeticiones de extracción	76
Figura 44. Porcentaje de inhibición de <i>Pantoea stewartii</i> por efecto de su exposición a extractos de hojas y tallos de tres especies silvestres de zarzamora. R.c = Rubus coriifolius, R ce = morfoespecie “Cerosa”, R.a = Rubus adenotrichos. *En el ensayo 2 no fue posible realizar el conteo de colonias.....	77
Figura 45. Inhibición de <i>Pantoea stewartii</i> por exposición a las fracciones cromatográficas post-Amberlita del extracto tallo Rubus adenotrichos. FNP=fracción no polifenólica, MFC=mezcla de fracciones cromatográficas polifenólicas, 1-2=fracción 1 y 2, 3-4=fracción 3 y 4, 5-6=fracción 5 y 6, 7-8=fracción 7 y 8, 9-10=fracción 9 y 10.....	78

RESUMEN

El género *Rubus* presenta plantas como la zarzamora y frambuesa que se desarrollan en varios Estados de la República Mexicana, entre los que destaca el estado de Michoacán, donde se han descrito especies consideradas como valiosos recursos de importancia económica. Los frutos de la zarzamora silvestre representan una fuente alterna para el ingreso familiar en las comunidades donde se desarrollan, mientras que los tallos y hojas se utilizan en la herbolaria tradicional gracias a la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana contra fitopatógenos, destacando *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Pseudomonas* spp. No obstante lo anterior, de las más de 700 especies de *Rubus* que se reportan en el mundo, sólo se ha evaluado el potencial antimicrobiano de un pequeño número ellas, de ahí la importancia de evaluar el potencial de las más de 20 especies mexicanas de *Rubus*.

Dentro de los principales compuestos reportados con actividad antimicrobiana se encuentran los polifenoles; éstos están extensamente distribuidos en diversos órganos de las plantas: flores, frutos, hojas, etc., ya que actúan como sustancias protectoras contra la radiación UV, como atrayentes de polinizadores y como mecanismos de defensa. En humanos, los polifenoles poseen efectos benéficos sobre la salud, actuando como potentes antioxidantes e interviniendo en la prevención de enfermedades de tipo crónico degenerativas. Actualmente, son pocos los estudios que se han hecho sobre la presencia y contenido de compuestos bioactivos en especies silvestres de *Rubus* en Michoacán; en este contexto, el presente proyecto pretende extraer compuestos polifenólicos a partir de distintos órganos de la planta para la evaluación de su capacidad microbicida generando evidencias sobre los compuestos involucrados en la herbolaria regional y sus posibles aplicaciones para el control biológico de fitopatógenos.

Se evaluaron tres materiales de zarzamora silvestre, *Rubus adenotrichos*, *Rubus coriifolius* y morfoespecies "Cerosa", preparando extractos de hojas y tallos. El mejor resultado de actividad antimicrobiana fue registrado por el extracto metanólico de tallo de *Rubus adenotrichos* que alcanzó un 97.78 % de inhibición del crecimiento de la bacteria fitopatógena *Pantoea stewartii*, porcentaje reflejado por la reducción de las UFC/mL en una unidad logarítmica. Esto permite proponer a las plantas evaluadas como fuentes de compuestos naturales para control biológico de microorganismos.

Palabras clave: frutillas, bioactividad, metabolitos secundarios, fitopatógenos

ABSTRACT

The *Rubus* genus presents plants as the blackberry and raspberry that develop in several States of the Mexican Republic, between which Michoacán's condition stands out, where there have been described species considered as valuable resources of economic importance. The fruits of the wild blackberry represent an alternate source for the familiar revenue in the communities where they develop, whereas the stems and leaves are in use in the traditional herbolaria thanks to the presence of compounds with antimicrobial activity against phytopathogens, emphasizing *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Pseudomonas* spp. Nevertheless they are more than 700 *Rubus*'s species in the world, only has evaluated the antimicrobial potential of a small number, which is why the importance of evaluating the potential of more than 20 *Rubus*'s Mexican species is explained. Among the principal compounds with antimicrobial activity there are polyphenols; these are extensively distributed in diverse organs of the plants: flowers, fruits, leaves, etc., since they operate as protective substances against the radiation UV, and as mechanisms of defense. In human beings, the polyphenols possess charitable effects on the health, acting like powerful antirust and intervening in the prevention of degenerative diseases of chronic type. Nowadays, there are small the studies that have been done on the presence and content of compounds bioactivos in *Rubus*'s wild species in Michoacán; in this context, the present the present project tries to extract polyphenolic compounds from different organs of the plant for the evaluation of his microbicide capacity generating evidences on of their possible applications for biological control. Here we evaluated three materials of wild blackberry, *Rubus adenotrichos*, *Rubus coriifolius* and morfoespecies "Waxen", preparing extracts of leaves and stems. The best result of antimicrobial activity was registered by the methanolic extract of stem of *Rubus adenotrichos* that reached 97.78 % of inhibition of the growth of *Pantoea stewartii*, percentage reflected by the reduction of the UFC/mL in a logarithmic unit. This allows to propose to the evaluated plants as sources of natural compounds for biological control of microorganism.

Keywords: berries, bioactiviry, secondary metabolites, phytopathogens

I. INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* presenta plantas como la zarzamora y frambuesa que se desarrollan en varios Estados de la República Mexicana, entre los que destaca el estado de Michoacán, donde se han descrito especies consideradas como valiosos recursos de importancia económica. Los frutos de la zarzamora silvestre representan una fuente alterna para el ingreso familiar en las comunidades donde se desarrollan, mientras que los tallos y hojas se utilizan en la herbolaria tradicional gracias a la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana contra patógenos, destacando *Staphylococcus aureus*, *Alternaria alternata*, *Candida albicans* y *Pseudomonas* spp. Por otro lado, especies silvestres del género *Rubus* han sido apreciadas como fuente de ingresos, medicina y alimento para pequeñas comunidades desarrolladas en regiones con climas fríos, principalmente. No obstante lo anterior, de las más de 700 especies de *Rubus* que se reportan en el mundo, sólo se ha evaluado el potencial antimicrobiano de un pequeño número ellas, de ahí la importancia de evaluar el potencial de las más de 20 especies mexicanas de *Rubus*.

Dentro de los principales compuestos reportados con actividad antimicrobiana se encuentran los polifenoles; éstos están extensamente distribuidos en diversos órganos de las plantas: flores, frutos, hojas, etc., ya que actúan como sustancias protectoras contra la radiación UV, como atrayentes de polinizadores y como mecanismos de defensa. En humanos, los polifenoles poseen efectos benéficos sobre la salud, actuando como potentes antioxidantes e interviniendo en la prevención de enfermedades de tipo crónico degenerativas. Recientemente ha sido reportada la actividad antimicrobiana de una amplia variedad de compuestos polifenólicos, aislados, en mezclas o en extractos, obtenidos de plantas usadas en la medicina tradicional de distintos países logrando la inhibición de microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, etc. ; sin embargo, las evaluaciones sobre la actividad de este tipo de compuestos frente a microorganismos fitopatógenos son limitados. Actualmente, son pocos los estudios que se han hecho sobre la presencia y contenido de compuestos bioactivos en especies silvestres de *Rubus* en Michoacán y su posible aplicación para el control de patógenos de cultivos; en este contexto, en el presente proyecto se pretende extraer compuestos polifenólicos a partir de distintos órganos de la planta para la evaluación de su capacidad microbicida frente a una bacteria fitopatógena generando evidencias sobre posibles fuentes alternativas y naturales para la obtención de compuestos con potencial de inhibición de microorganismos y plagas, que sean amigables con el ambiente y de fácil degradación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ZARZAMORA

2.1.1. Generalidades del género *Rubus*

Las Rosaceae incluyen varios géneros de taxonomía muy complicada y controvertida (incluido *Rubus*), por lo que el cálculo del número, sobre todo de las especies, es bastante incierto. Se consideran unos 100 géneros con 2000 a 3000 especies representadas en todo el mundo, pero principalmente en regiones templadas y subtropicales del Hemisferio Norte. El género *Rubus* es de taxonomía sumamente complicada, pues a menudo existen dificultades en la circunscripción de las especies y mientras algunos autores le adscriben unas 700 otros reconocen sólo alrededor de 250. Se encuentra distribuido principalmente en las comarcas de clima templado y frío del Hemisferio Norte, pero también presente en zonas montañosas intertropicales. Muchos de sus representantes tienen frutos comestibles conocidos como “zarzamoras” y “frambuesas” y varios se cultivan para tal propósito, como por ejemplo *R. idaeus* L. Las especies de *Rubus* suelen ser muy variables, aparentemente como resultado de la frecuente reproducción apomíctica e hibridación. Los componentes mexicanos del género necesitan de una profunda revaloración a la luz del gran número de colectas recientes (Rzedowski y Calderón, 2005).

En el estado de Michoacán, se han encontrado diferentes especies pertenecientes a este género, ejemplo de ellas son *Rubus coriifolius*, colectada en el norte del estado en localidades pertenecientes a la cuenca del Balsas presentando hojas de textura coriácea y tallos densamente pubescentes pero carentes de pelos glandulares; *Rubus adenotrichos*, que ha sido un elemento frecuente y a menudo abundante en el norte de Michoacán, propia principalmente de la vegetación secundaria derivada de bosques húmedos de conífera y de encino, así como del bosque mesófilo de montaña (2100-2800 m.). Esta zarzamora es la más común de la región purépecha. Sus frutos, de buen tamaño y sabor, se venden con frecuencia en los mercados locales y se utilizan para la elaboración de mermeladas, tamales y dulces. La planta se emplea asimismo en medicina tradicional; *Rubus cymosus*, también es un elemento frecuente en la vegetación secundaria derivada de bosques de encino, de coníferas y del bosque mesófilo de montaña, a menudo a orilla de caminos y en cercas en el norte de Michoacán, a una altura de 1800 a 2800 m. En similares condiciones geográficas y de vegetación mencionadas para las especies anteriores, se ha encontrado a *Rubus humistratus* (1150-2700 m.), *Rubus pringlei* (2300-3200 m.) y *Rubus pumilus*, presentándose como elemento poco frecuente pero a veces localmente abundante

en los bosques húmedos de coníferas del norte de Michoacán (2700-3600 m.), y siendo una planta endémica de México y poco común (Rzedowski y Calderón, 2005).

2.1.2. Descripción botánica

La zarzamora es una planta bienal que desarrolla en el primer año un tallo estéril y en el segundo aparecen tallos fértiles; son herbáceas perennes, arbustivas o subarbustivas (Cruz, 1997; Rzedowski y Calderón, 2005).

Tallo. El tallo principal es de crecimiento erecto, semirastrero o rastrero; frecuentemente provisto de agujones curvados, espinas, y pelos, aunque puede carecer de ellos. Existen especies en las que el tallo principal está revestido de pruina azul-blanquecina, que puede ser claramente visible o presentarse en forma de una fina película blanca. La pilosidad es variable entre las especies, pudiendo encontrarse tallos glabros o pelosos. La zona central del tallo es el carácter morfológico que presenta menos variabilidad entre especies (Monasterio-Huelin, 1992; Cruz, 1997; Rzedowski y Calderón, 2005). Los tallos, también llamados cañas, también se desarrollan bajo el suelo emitiendo durante nuevos brotes llamados “primocañas” los cuales se desarrollan vegetativamente durante el primer año; los brotes se denominan “floricañas” cuando alcanzan su desarrollo reproductivo en el segundo año, florecen, fructifican y mueren (Cruz, 1997; Rzedowski y Calderón, 2005).

Hojas. Son persistentes o deciduas, pecioladas, estipuladas, simples o compuestas o imparipinadas (Sánchez, 1974).

Flores. Perfectas, en racimos, panículas, corimbos, en fascículos o solitarias; son hermafroditas o raramente unisexuales, con pedicelo generalmente glanduloso. Cáliz persistente de 5 sépalos, con tubo corto y ancho, generalmente con 5 lóbulos. Corola de cinco pétalos. Estambres numerosos y, en algunas especies, libres; filamentos filiformes, ovario súpero de numerosos carpelos dispuestos sobre un receptáculo convexo, dos óvulos por carpelo. Estilo subterminal y filiforme; estigma simple o capitado. Las flores aparecen sobre los extremos de los brotes laterales del segundo año (Cruz, 1997; Rzedowski y Calderón, 2005).

Fruto. El fruto verdadero es una drupela que encierra una semilla. El fruto comestible es un agregado compuesto de la unión de varias drupelas sobre un receptáculo. Las drupelas rara vez se desprenden del receptáculo para caer separadamente (Cruz, 1997; Rzedowski y Calderón, 2005).

2.1.3. Clasificación taxonómica

La zarzamora pertenece al género *Rubus* y presente variabilidad en especies debido, principalmente, a la frecuente reproducción apomíctica e hibridación (Rzedowski y Calderón, 2005)

Reino: Plantae

Superphylum: Tracheophyta

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Rosoidae

Género: *Rubus*

Especie: *Rubus* sp.

(CONABIO, 2014)

2.1.4. Importancia

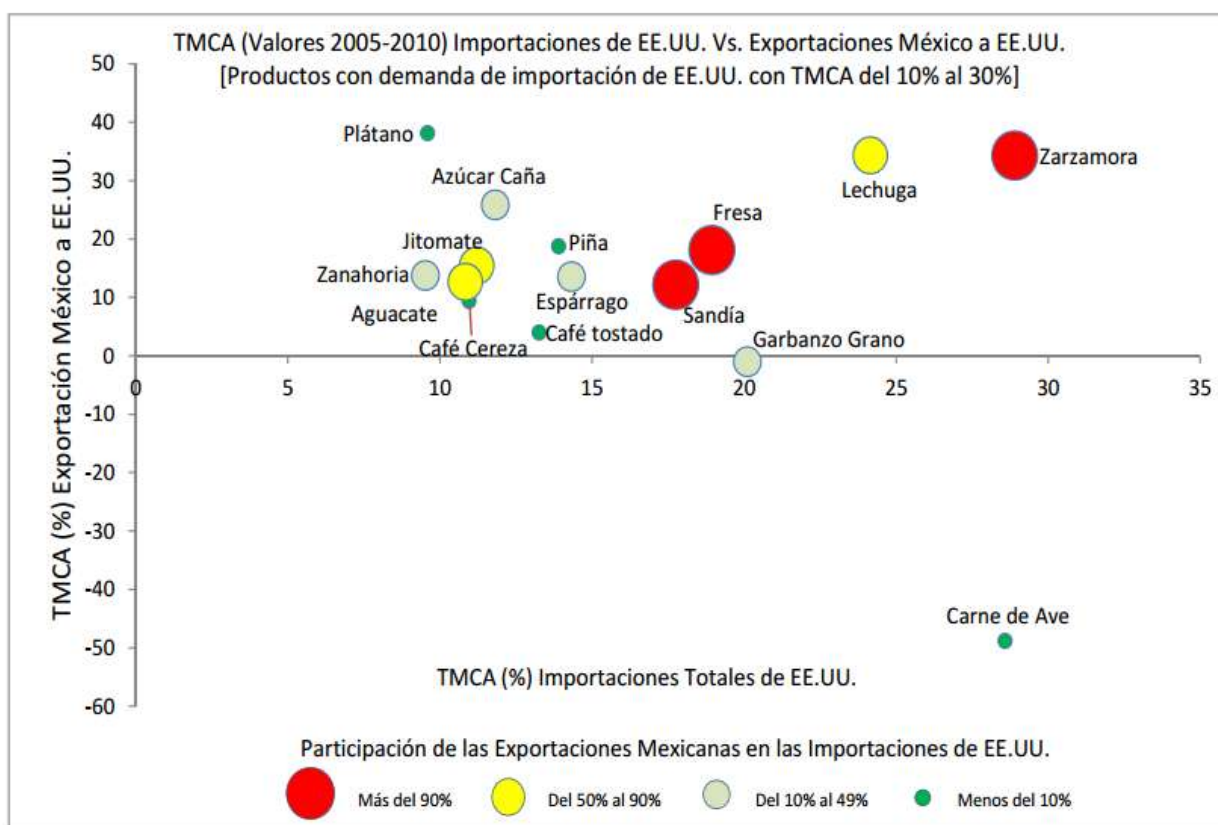
Ecológica

El impacto ecológico de especies silvestres del género *Rubus* es observado en la conservación del suelo dentro de los bosques donde se desarrollan, debido a que amortiguan el impacto de las gotas de lluvia lo que permite la retención y conservación de la humedad del suelo, influyendo en la recarga de los mantos freáticos (Cruz, 1997).

En Michoacán, existen diversos recursos silvestres de importancia frutícola entre los que se encuentran algunas morfoespecies de zarzamora (*Rubus* spp.). Estos materiales se localizan en áreas boscosas y templadas, en altitudes de 1550 a 2300 msnm. Ha sido reportada la existencia de al menos 7 diferentes morfoespecies silvestres en Michoacán, entre las que se encuentran *R. tricomallus*, *R. ulmifolius*, *R. adenotrichos* y *R. glaucus* (Rzedowski y Calderón, 2005).

Económica

En México, los cultivos de frutillas (fresa, frambuesa, zarzamora y arándano) abarcan una superficie de 19 mil 645 hectáreas con una producción de más de 385 mil 928 toneladas en Michoacán, Jalisco, Baja California, Guanajuato, Colima y Estado de México y un valor de producción de 550 millones de dólares al año, proyectándose la suplicación de la superficie de cultivo y ganancias en 5 años (SIAP, 2014; SAGARPA, 2014). Para 2011, México ya producía casi 400 mil toneladas de frutillas, con un valor de producción de 7 mil 019 millones de pesos ocupando el sexto lugar mundial en producción de fresa (224 mil toneladas) y el tercer lugar en la exportación del mismo fruto. Actualmente se destaca que toda la zarzamora que se consume en Europa proviene de México y es uno de los principales exportadores de zarzamora a Estados Unidos (Figura 1). Por todo lo anterior, se reconoce a México como un país con las condiciones climáticas, productivas y sanitarias para la producción, industrialización y comercialización de frutillas (SAGARPA, 2014).



Fuente: SAGARPA, 2014

Figura 1. Tendencia de consumo nacional aparente (TMCA) expresado en el porcentaje de importaciones y exportaciones México-Estados Unidos

La industrialización de las frutillas genera a nivel nacional entre 80 mil y 100 mil empleos directos e indirectos, la gran mayoría se ubican en Michoacán y Jalisco con su consecuente derrama económica. En respuesta a la demanda de frutillas

(zarzamora, fresa, frambuesa y arándano) en diferentes países del mundo, productores y agroindustriales de clase mundial están desarrollando proyectos de expansión de cultivos en entidades del país con características climáticas óptimas, calidad de suelo y oportunidad de periodos estacionales, destacando Michoacán, Colima y Jalisco; las frutillas son los cultivos de mayor rentabilidad de la industria hortofrutícola e importantes generadores de divisas y empleos para el campo nacional, por ello se destaca la necesidad de expandir estos cultivos en el país. Un ejemplo de las estrategias ya establecidas por instituciones gubernamentales, en colaboración con empresas privadas, es el aumento de la producción y comercialización de frutillas en el país contemplando, en una primera etapa, el incremento en 2 mil hectáreas la superficie de cultivo en zonas probadas de Michoacán, Jalisco y Baja California, lo que significa la generación de 15 mil empleos (SAGARPA, 2014).

Alimenticia

La explotación del fruto de zarzamora con fines alimenticios de manera tradicional ha sido registrada para el estado de Michoacán; se conoce el consume de los frutos en fresco además de su utilización en alimentos regionales como tamales, atole, bebidas fermentadas y endulzadas, dulces, etc. (Bello-González, 2006).

Al igual que otros frutos, las frutillas (incluyendo arándano, frambuesa, zarzamora, etc.) contienen macro y micronutrientes como vitaminas, minerales y fibra (Cuadro 1); sin embargo sus propiedades biológicas se han atribuido a sus altos niveles de compuestos fenólicos así como a la sinergia interactiva entre sus componentes fitoquímicos naturales (Seeram, 2008; Szajdek y Borowska, 2008). La zarzamora se destaca además por su contenido en manganeso, el cual interviene en el metabolismo de algunas vitaminas, así como también en el mecanismo de transmisión de impulsos nerviosos (Guyton y Hall, 2006).

Cuadro 1. Comparación del contenido nutrimental de frutilla

NUTRIENTE	UNIDAD	ZARZAMORA	ARÁNDANO	FRAMBUESA
Agua	(g)	88.15	84.21	85.75
Proteína	(g)	1.39	0.74	1.2
Lípidos	(g)	0.49	0.33	0.65
Cenizas	(g)	0.37	0.24	0.46
Carbohidratos Totales	(g)	9.61	14.49	11.94
Fibra dietética	(g)	5.3	2.4	6.5
Sacarosa	(g)	0.07	0.11	0.2
Glucosa	(g)	2.31	4.88	1.86
Fructosa	(g)	2.4	4.97	2.35
Ca	(mg)	29	6	25
Mg	(mg)	20	6	22
Fe	(mg)	0.62	0.28	0.69
P	(mg)	22	12	29
K	(mg)	162	77	151
Na	(mg)	1	1	1

Zn	(mg)	0.53	0.16	0.42
Mn	(mg)	0.646	0.336	0.67
Vitamina C	(mg)	21	9.7	26.2
Vitamina B6	(mg)	0.03	0.052	0.055
Vitamina E	(mg)	1.17	0.57	0.87

Fuente: USDA, 2014

Debido al creciente interés en evaluar los fitoquímicos de una amplia variedad de especies vegetales, basándose principalmente en un punto de vista etnobotánico y etnofarmacobiológico de distintas regiones del mundo, la composición química y las propiedades para promover la salud de las moras encontradas en Norteamérica y Europa han sido ampliamente exploradas, mientras que aquellas que son nativas de América, particularmente de América del Sur, han recibido poca atención. Con lo anterior se destaca la importancia de ampliar el estudio de la química, actividad biológica y comercialización de frutos nativos (Schreckinger *et al.*, 2010)

Social

Actualmente, la producción de frutillas (zarzamora, fresa, frambuesa y arándano) se concentran en 4 entidades federativas de México con un impacto social que se traduce en la generación de 8 empleos por hectárea cultivada y la entrada de divisas por concepto de exportaciones al mercado de Norteamérica y Países Europeos (SAGARPA, 2014). Sin embargo, el papel de estos frutos para diversas comunidades en el mundo es preponderante como base de su alimentación y medicina tradicional, lo cual pone de manifiesto su importancia en la sociedad.

Por otro lado, especies silvestres del género *Rubus* han sido apreciadas como fuente de ingresos, medicina y alimento para pequeñas comunidades desarrolladas en regiones con climas fríos, principalmente. Ejemplo de lo anterior es el importante papel de las frutillas en la dieta Nórdica; cerca de 50 diferentes frutillas crecen en la región norte y la mitad de ellas son comestibles. La frutillas silvestres mayormente conocidas y comercializadas en esa zona son, por su nombre en inglés, lingonberry, bilberry, raspberry, cloudberry, cranberry, buckthorn berry y crowberry. En Finlandia, para 2003, la producción anual de lingonberry y bilberry fue de 500 y 250 millones de kg, respectivamente, evidenciando su fundamental papel para esa sociedad (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005).

En otras zonas de mundo, zarzamoras, frambuesas y arándanos silvestres son altamente apreciadas para las comunidades que las consumen. América del Norte sostiene que una amplia variedad de moras son parte integral del conocimiento ecológico tradicional de tribus indígenas del Ártico; *Rubus spectabilis* y *Rubus chamaemorus* han sido utilizadas para preparar diversos remedios usados en el tratamiento de heridas y afecciones ginecológicas, siendo ambas especies importantes para distintas tribus de esa región. Las hojas y brotes de la planta de zarzamora se utilizan para el tratamiento de malestares estomacales y diarrea,

además los pobladores la reconocen como una planta cuyo consumo permite evitar daños en el riñón. Adicional a lo anterior, las moras silvestres del Ártico son un alimento ampliamente consumido y, por ejemplo, las poblaciones Inuit de Alaska utilizan los frutos para fermentarlos y obtener bebidas y vinagres utilizados para cocinar (Kellogg *et al.*, 2010).

Medicinal

La zarzamora tiene diversos usos en la herbolaria tradicional, entre los que destaca su capacidad para curar heridas; las hojas y tallos jóvenes poseen propiedades antibacterianas y antiinflamatorias ayudando a eliminar microorganismos presentes en heridas en la piel y a disminuir la hinchazón. Particularmente, las hojas destacan por su astringencia empleándose en infusión para tratar desórdenes estomacales, dolor de garganta, boca y úlceras e inflamaciones de la lengua y encías (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003). Estos usos en la medicina tradicional en diferentes países han generado nuevas líneas de investigación en la búsqueda de los compuestos activos presentes en las plantas y que les proporcionan diversas propiedades. En este sentido, numerosos estudios sobre las actividades biológicas de los compuestos fenólicos en la zarzamora han sido desarrollados, revelando su impacto en la prevención y tratamiento de distintos padecimientos, incluidos los del tipo crónico degenerativo (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2006); también se ha evaluado su impacto positivo en enfermedades neurodegenerativas, obesidad y cáncer (Juranić y Zixack, 2005; Zafra-Stone, 2007).

El estudio de los diversos potenciales biológicos de la zarzamora con aplicaciones medicinales ha sido abordados desde distintas perspectivas: inicialmente se destacó su potencial o actividad antioxidante (Garzón *et al.*, 2009; Estupiñán *et al.*, 2011) haciendo una comparación con distintos frutos (Kähkönen *et al.*, 2001; Benvenuti *et al.*, 2004; Pantelidis *et al.*, 2007; Egea *et al.*, 2010), entre distintos cultivares de zarzamora (Siriwoharn *et al.*, 2004) y contrastando a las variedades mejoradas con las especies silvestres (Deighton *et al.*, 2000; Ugurtan-Yilmaz *et al.*, 2009; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010); otros frutos pertenecientes al género *Rubus* también han sido ampliamente estudiados para conocer su actividad antioxidante, tal es el caso de la frambuesa silvestre y cultivada (Mullen *et al.*, 2002; Venskutonis *et al.*, 2007; Çekiç y Özgen, 2010; Bobinaitė *et al.*, 2012). Esta actividad ha sido atribuida particularmente al contenido de compuestos fenólicos y polifenólicos en los frutos evaluados (Mertz *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2008). Sin embargo, recientemente han sido publicados trabajos críticos sobre el efecto antioxidante “real” de los compuestos fenólicos contenidos en frutos como

zarzamora, arándano, cerezas, fresas, etc. y su repercusión en la salud de los consumidores; el tema principal de la controversia es la extrapolación de los resultados obtenidos en evaluaciones *in vitro* a condiciones *in vivo*, discutiéndose, entre otros puntos, la biodisponibilidad y bioeficiencia (Manach *et al.*, 2005) de estos compuestos en el organismo de quienes los adquieren en su dieta (Berger *et al.*, 2012) y demostrándose contrastantemente el potencial de los flavonoides, principalmente, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en experimentos bajo condiciones fisiológicas (Tavares *et al.*, 2012). Con todo lo anterior, se evidencia la necesidad de continuar con investigaciones que constaten la efectividad de los compuestos bioactivos de frutillas como la zarzamora para conocer y entender sus funciones, estabilidad, disponibilidad, posibles usos, etc.

2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

Aspectos únicos del metabolismo vegetal

Una característica importante de todos los organismos es su habilidad para regular la tasa de los procesos metabólicos en respuesta a un ambiente cambiante tanto interna como externamente. Esta regulación asegura la homeóstasis mediante la conservación de la estabilidad del medio/ambiente intracelular; esto a su vez mantiene a un organismo en un estado eficiente. El metabolismo de las plantas es, por necesidad, un proceso complejo; debe ser flexible y robusto, debido a la naturaleza sésil de las plantas y su exposición a condiciones ambientales fluctuantes y frecuentemente impredecibles. Adaptaciones anatómicas, bioquímicas y fisiológicas son necesarias para permitir que una planta soporte el estrés ambiental incluyendo calor, frío, sequía, salinidad, limitación en nutrientes y anoxia; además, las plantas verdes exhiben un metabolismo complejo resaltando su naturaleza autotrófica, su capacidad biosintética y su peculiar división celular y subcelular. Los principales mecanismos de regulación metabólica encontrados en plantas son generalmente similares a aquellos presentes en otros organismos, lo que hace que las plantas se separen del resto de los organismos es, sin embargo, la diversidad de su metabolismo, tal y como lo evidencia la variedad de químicos de defensa que producen y la flexibilidad de su metabolismo que les permite optimizar el uso de sus fuentes de alimento (Bowsher *et al.*, 2008). El estrés medioambiental modula significativamente los perfiles fitoquímicos en las plantas; el estrés biótico y abiótico presente en la naturaleza es soportado por las plantas a través de adaptaciones de defensa química, promoviendo una composición fitoquímica potencialmente compleja en las especies silvestres comparadas con sus variedades cultivadas (Kellogg *et al.*, 2010). Adicionalmente, los mecanismos precisos de regulación de una ruta o enzima particular podrían no ser iguales entre especies o incluso entre distintas ubicaciones dentro del mismo organismo o bajo diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto es importante entender la regulación metabólica en las plantas si queremos comprender el funcionamiento de estos organismos; no es suficiente asumir que se puede extrapolar información

obtenida de fuentes no vegetales y predecir el comportamiento de una planta ante un estímulo (Bowsher *et al.*, 2008)

Los metabolitos secundarios, de una enorme variedad química, juegan un importante papel en los organismos que los producen, pueden funcionar como moléculas señal en las relaciones planta con planta, planta con herbívoro, planta con microorganismo, animal con animal y animal con predador. Frecuentemente los metabolitos secundarios sirven como compuestos de defensa química contra herbívoros y predadores, microbios, virus y entre plantas que compiten. Estos metabolitos son, por tanto, de primordial importancia para el buen funcionamiento de los organismos que los producen o que los requieren. Para entender la variabilidad estructural de los metabolitos secundarios, su función biológica y su potencial de explotación biotecnológica (utilización en farmacología, en medicina como agentes terapéuticos, en agricultura como biopesticidas, etc.), se requiere información detallada de su bioquímica (producción y acumulación en espacio y tiempo) y ecología (funciones en plantas y animales; Wink, 2000)

Las plantas interactúan con otros organismos vivos de diferentes maneras, brindando alimento a los herbívoros y actuando como hospederos de patógenos bacterianos y fúngicos, etc. Los venenos y compuestos químicos de defensa sirven para reducir estas interacciones negativas las cuales podrían resultar en un severo daño para la planta. Sin embargo, debido a que las plantas son inmóviles, la mayoría de las angiospermas necesitan atraer a los animales para su reproducción y dispersión de la semilla. El delicado balance entre el rechazo de herbívoros y patógenos, y la atracción de polinizadores se mantiene gracias a la producción una gran diversidad de químicos especializados, los metabolitos secundarios. Debido a que los patógenos o herbívoros desarrollan resistencia a esos químicos, las plantas desarrollan la capacidad de producir nuevos compuestos en una continua carrera armamentista que agrega diversidad química y complejidad biosintética a los productos químicos producidos por las plantas. Más de 100,000 diferentes metabolitos secundarios han sido identificados en plantas, y cerca de la mitad de ellos pertenecen a los tres grandes grupos: alcaloides (12,000), fenólicos (10,000) y terpenoides (25,000; Bowsher *et al.*, 2008)

Características generales, ubicación y acumulación

Una característica típica de las plantas es la producción de una gran diversidad de metabolitos secundarios incluyendo compuestos libres de nitrógeno (v.g. terpenos, saponinas, etc.) y compuestos que contienen nitrógeno (v.g. alcaloides, aminas, etc.). Numerosos metabolitos secundarios se encuentran comúnmente acompañados por docenas de compuestos menores; como resultado se obtienen mezclas complejas que difieren en función y localización en la planta ya que

existen diferencias de órgano a órgano en una misma planta y éstos también varían entre especies. Estos compuestos son sintetizados en las plantas en tejido, órgano y rutas específicos por enzimas biosintéticas igualmente específicas (Wink, 2000).

La organización y estructura de la célula vegetal conlleva a la compartimentación del metabolismo. Numerosas reacciones metabólicas de una ruta pueden estar localizadas en un sitio específico en la célula o en organelos particulares. El metabolismo de la planta es dependiente de la separación lo cual ha sido establecido desde tiempo atrás. La concentración de un metabolito, cofactor o efector en un compartimento particular permitiría establecer un ambiente más favorable para la acción enzimática. La compartimentación metabólica también separa los intermediarios de las enzimas lo cual evita reacciones indeseables o la generación de subproductos que inhiben un proceso particular. La localización de enzimas y metabolitos en un mismo compartimento puede provocar mayor eficiencia en una ruta metabólica e interacción entre rutas. Sin embargo, la separación significa que los diferentes componentes de una célula vegetal interactúan en distintos niveles. Los sustratos frecuentemente deben desplazarse entre compartimentos desde el sitio de biosíntesis hasta el lugar donde serán utilizados; este desplazamiento involucra transportadores y una alta regulación y coordinación para mantener el flujo apropiado a través de ese paso (Bowsher *et al.*, 2008)

Los metabolitos secundarios tienen una característica particular que es su acumulación y almacenamiento en altas concentraciones en las plantas que los producen. En general, los compuestos hidrofílicos se almacenan en la vacuola mientras que las sustancias lipofílicas son depositadas en ductos para resinas, laticíferos, tricomas, células específicas o en la cutícula. Por otro lado, como los sitios de síntesis no necesariamente son los sitios de almacenamiento, para algunas sustancias se han descubierto sistemas de transporte de larga distancia por el xilema, floema y por vías apoplásticas. En la mayoría de las plantas, la síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios está regulada en espacio y tiempo. Como regla, los tejidos vulnerables son más defendidos que aquellos que son viejos o senescentes; por ejemplo, usualmente se observa que las semillas, plantas jóvenes, brotes y tejidos jóvenes, demandan grandes cantidades de compuestos de defensa o los sintetizan activamente los órganos que son importantes para la sobrevivencia y multiplicación, como las flores, frutos y semillas, por ello éstos se convierten en fuente de defensas químicas. Esa localización específica de los metabolitos tiene sentido si su función es actuar como señal o defensa. Los tricomas y pelos glandulares siempre se encuentran en la superficie de la planta; un herbívoro no puede evitar estar en contacto directo con ellos si trata de alimentarse de la planta. Si los terpenos activos que se encuentran en la membrana alcanzan sus labios, lengua o mandíbula, muchos

herbívoros pueden ser disuadidos antes de que comiencen a alimentarse de la planta. Otro ejemplo es el almacenamiento de altas concentraciones de metabolitos secundarios en las vacuolas, que se posicionan en sitios favorables para la defensa, encontrándose principalmente en células epidérmicas y subepidérmicas; si un herbívoro o microorganismo ataca esa planta se enfrentará inmediatamente a una elevada concentración de metabolitos secundarios cuando se lastime o penetre el tejido, lo cual podría igualmente disuadirlo que se siga alimentando de la planta. Es importante señalar que los compuestos que se encuentran en ductos de resina y laticíferos están almacenados a altas presiones por lo que se liberarán rápidamente cuando esas zonas sean lastimadas (Wink, 2000).

Funciones

Los metabolitos secundarios cumplen diversas funciones en las plantas que los producen (Figura 2): sirven para protección contra virus, bacterias, hongos, plantas de competencia y contra herbívoros (babosas, caracoles, artrópodos y vertebrados). Adicionalmente, dichos metabolitos pueden servir como compuestos de atracción (v.g. monoterpenos fragantes, carotenoides y antocianinas coloridas) de animales para la polinización y para la dispersión de la semilla. En distintas instancias, ambas actividades son exhibidas por los mismos compuestos: las antocianinas y los monoterpenos pueden ser atrayentes de insectos cuando se encuentran en las flores pero al mismo tiempo son insecticidas y antimicrobianos en las hojas. Algunos compuestos concomitantemente exhiben funciones fisiológicas; por ejemplo, protectores de la planta contra la radiación UV. Esta característica de los metabolitos secundarios, ser multifuncionales, es típica para estos compuestos y no contradice su papel principal como compuestos señal y de defensa (Wink, 2000).

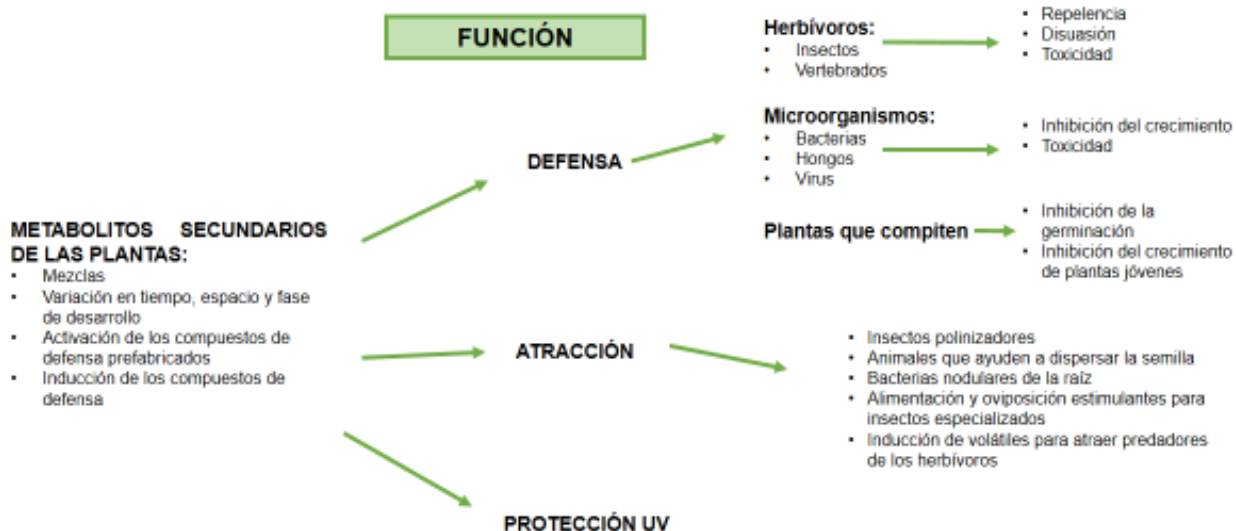


Figura 2. Funciones de los metabolitos secundarios en las plantas

Explotación y uso

Los productos naturales han sido utilizados por el hombre desde la antigüedad para un gran número de aplicaciones, como drogas, agentes para el manejo de plagas, pigmentos y saborizantes, por mencionar algunos. Sin embargo, la humanidad no estaba consciente de la importancia específica y la distinta naturaleza química de los compuestos presentes en esos productos naturales; hasta el final del siglo XIX y a principios del siglo XX, los productos experimentaron un surgimiento como una importante rama de la química orgánica para comprenderlos. Muchos factores conllevaron a este cambio, incluyendo la percepción de la naturaleza como un selector de actividades biológicas, el gran número de compuestos de fuentes botánicas aún no descubiertos y al hecho de que pocos de los compuestos naturales conocidos habían sido biológicamente caracterizados. Adicionalmente, la instrumentación analítica moderna y las adaptaciones hechas a microbioensayos han permitido que la labor de descubrimiento de compuestos requiera menos tiempo y sea menos laboriosa;

nuevas estrategias para el estudio de los compuestos vegetales se basan en el conocimiento etnobotánico de las comunidades para realizar una exploración mucho más completa del mundo vegetal y de los compuestos que podrían usarse directamente como farmacéuticos o en la agricultura, acoplándolo con el uso de poderosas técnicas espectroscópicas y cromatográficas que permiten el aislamiento e identificación de compuestos individuales (Bidlack *et al.*, 2000; Macías *et al.*, 2007). De manera interesante, un cuarto de los medicamentos prescritos en países industrializados contienen compuestos directamente derivados de las plantas o compuestos que sufrieron modificaciones de manera sintética; en países en desarrollo, el 80 % de la población utiliza extractos vegetales para el tratamiento de enfermedades (Bowsher *et al.*, 2008).

Los metabolitos secundarios poseen una vasta variedad de aplicaciones en biotecnología (Figura 3). Una de las principales áreas biotecnológicas donde participan los metabolitos secundarios es la fitomedicina; cientos de plantas son utilizadas alrededor del mundo para incluirlas en los alimentos y para tratar enfermedades. Además del aislamiento de las sustancias con perfiles farmacológicos establecidos (v.g. alcaloides), también se utilizan con frecuencia complejos extractos vegetales. Por otro lado, debido a que los metabolitos secundarios son insecticidas, fungicidas y fitotóxicos, éstos pueden ser utilizados en la agricultura como protectores naturales de las plantas. Antes del advenimiento de los pesticidas sintéticos hace más de 50 años, los insecticidas derivados de las plantas (nicotina, piretrinas, rotenona, etc.) eran un tema común. Las aplicaciones mostraron inequívocamente que funcionaban; una ventaja ecológica es que el metabolito secundario se degrada rápidamente en las plantas y en el suelo, que también es su desventaja ya que los pesticidas sintéticos son más resistentes y persistentes. Además, los pesticidas modernos usualmente son más potentes que los biopesticidas; las plantas crecen fácilmente y los biopesticidas podrían ser una fuente sostenible de protectores de plantas para los agricultores en países donde no tienen acceso a los pesticidas sintéticos fácilmente (Wink, 2000).



Figura 3. Utilización de los metabolitos secundarios en biotecnología

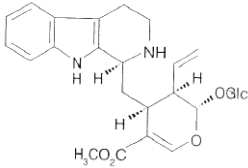
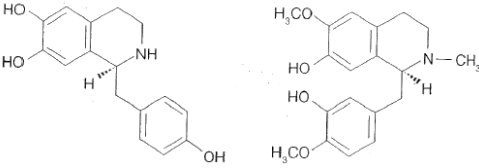
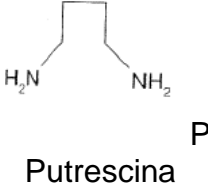
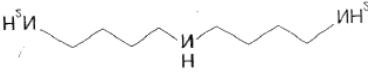
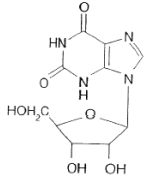
2.2.1. Alcaloides

Los alcaloides se definen como moléculas orgánicas que consisten en numerosos estructuras cíclicas que contienen usualmente uno o más átomos de nitrógeno, pero no siempre, localizado dentro del anillo de átomos de carbono. La estructura de este anillo de carbono se utiliza para la clasificación de estos compuestos, siendo los principales grupos de alcaloides protopina, piperidina, pirrolidina, piridina, quinolina, quinolicidina, quinazolina, imidazol, tropano, pirrolizidina, purina, isoquinolina e indol-terpenoides (Bowsher *et al.*, 2008).

Clasificación

Los alcaloides son sintetizados, aunque existen excepciones, a partir de un pequeño número de L-aminoácidos, particularmente arginina, lisina, fenilalanina, triptófano y tirosina que actúan como precursores (Cuadro 2). En muchos casos, otra característica común en la biosíntesis de alcaloides es la generación de un intermediario central que sirve como precursor de todos los alcaloides producidos por esa ruta en particular (Bowsher *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Clases principales de alcaloides, aminoácido precursor e intermediario central del cual derivan

Tipo de alcaloide	Aminoácido precursor	Intermediario(s) central(es)
Indol-terpenoide	Triptofano	
Vinblastina		Estrictosidina
Isoquinolina	Tirosina	
Morfina		(S)-Norcoclaurina (S)-Reticulina
Tropano	Arginina Ornitina	
Hiosciamina		Putrescina
Pirrolizidina	Arginina Ornitina Isoleucina Leucina	
Senecionina		Homospermidina
Purina	Aspartato Glutamina Glicina	
Cafeina		Xantosina

Los 5 grupos de alcaloides representados en la tabla anterior son los compuestos de este tipo más abundantes en las plantas. Las rutas biosintéticas que conllevan

a la producción de alcaloides en general son muy variadas y, en ocasiones, altamente ramificadas. Los alcaloides del tipo indol-terpenoide poseen en común un grupo terpénico derivado del isopentenil difosfato, y un grupo indol derivado de la triptamina. Por su parte, los del tipo isoquinolina son producidos a partir de la tirosina y subdivididos en grupos más específicos (Figura 4.); su formación requiere la unión de dos moléculas de tirosina, seguida de una serie de hidroxilaciones, desaminaciones y descarboxilaciones. Los alcaloides del grupo del tropano son ésteres de ácidos carboxílicos y tropina; su ruta de síntesis es altamente ramificada compartiendo precursores de la nicotina y de los derivados de pirrolizidina. Estos compuestos se forman a partir del ácido néxico y de los aminoácidos leucina o isoleucina. Finalmente, la síntesis de los derivados de purina comienza con la xantosina, la cual proporciona el anillo característico de estos compuestos para posteriormente sufrir metilaciones y reacciones de óxido-reducción, principalmente, para producir cafeína (Bowsher *et al.*, 2008).

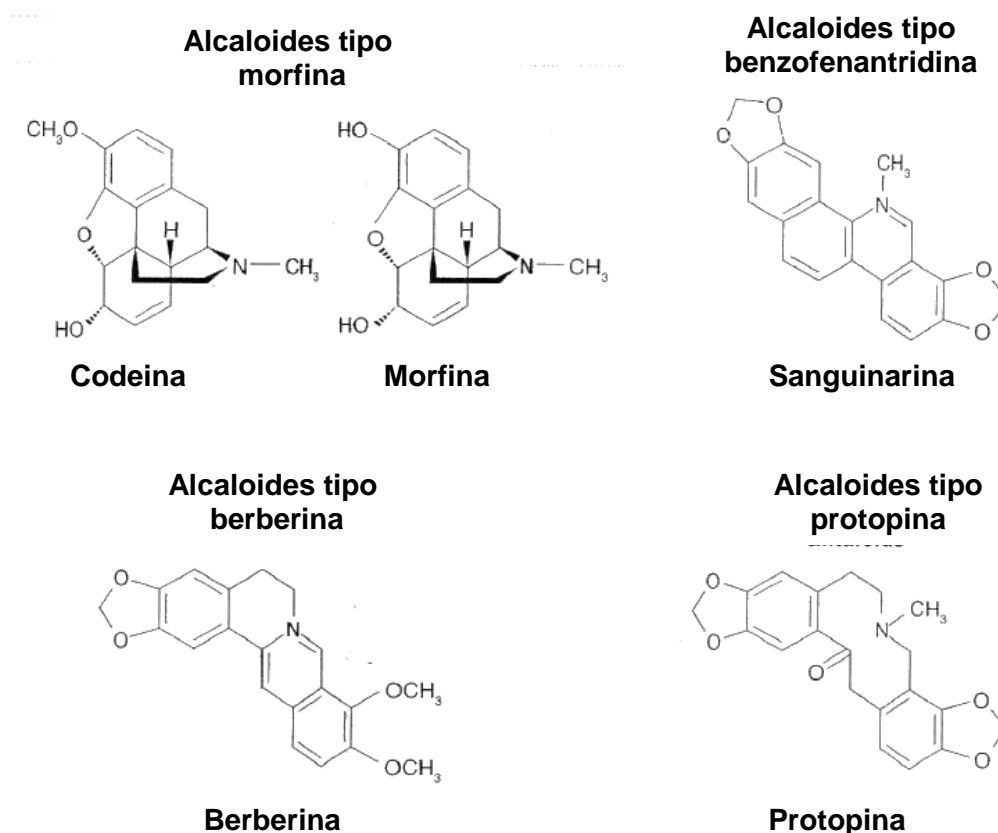


Figura 4. Alcaloides del tipo isoquinolina

Función

Los alcaloides poseen distintas funciones en las plantas: como venenos, barreras para herbívoros, defensas antimicrobianas e inhibidores de la germinación. Como venenos pueden ser muy efectivos, siendo particularmente tóxicos para vertebrados y, por tanto, sirven como químicos de defensa que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (encontrados en el 20 % de todas las especies vegetales). Muchos alcaloides tienen propiedades antimicrobianas y protegen a la planta de infecciones bacterianas y fúngicas; por otro lado, algunos alcaloides funcionan como inhibidores de la germinación y reducen la competencia de otras plantas en un proceso llamado alelopatía donde la liberación de un químico de una planta altera el crecimiento o desarrollo de otra planta vecina. Los herbívoros logran evadir a las plantas que contienen alcaloides debido a que estos compuestos brindan un sabor amargo, y es por ellos que sirven como barrera para estos organismos logrando su repulsión antes de que consuma una dosis tóxica. Algunos animales utilizan los alcaloides para la protección contra predadores, sin embargo existe muy poca evidencia de la biosíntesis de estos compuestos en el reino animal. En lugar de ello los animales que acumulan alcaloides aparentan adquirirlos a través de su dieta, ya sea directamente de las plantas o indirectamente de otros herbívoros. Este medio de defensa es más comúnmente utilizado por invertebrados, particularmente los pertenecientes al orden Lepidoptera, y son raramente utilizados por vertebrados (Bowsher *et al.*, 2008).

2.2.2. Terpenoides

Los terpenoides son la clase de productos naturales más extensa contando con 25,000 diferentes formas identificadas en plantas superiores. Los terpenoides no se encuentran presentes únicamente en las plantas, también son sintetizados en animales, bacterias, hongos y algas. Es importante mencionar que el término terpenoide es generalmente empleado como sinónimo de terpeno, definiendo a un solo grupo de químicos vegetales, sin embargo los dos nombres pertenecen a distintas clases de compuestos: los terpenos son moléculas hidrocarbonadas (v.g. limoneno), mientras que los terpenoides son análogos de los terpenos pero que incluyen átomos de oxígeno en su estructura (v.g. mentol). Los terpenoides también pueden ser referidos como isoprenoides porque muchos de ellos liberan isopreno cuando se rompe la molécula (Bowsher *et al.*, 2008).

Clasificación y biosíntesis

La biosíntesis de terpenoides puede ser dividida en 4 fases:

1. Producción de las unidades básicas de 5 carbonos, isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP).
2. Condensación del IPP y DMAPP por acción de preniltransferasas para formar los precursores de terpenoides como el geranil y farnesil difosfato.
3. Conversión de estos precursores a las estructuras “progenitoras” de los terpenoides, catalizada por terpeno sintasas.

4. Modificación de los esqueletos terpenoides para introducir diversidad estructural.

Estas fases para la obtención de terpenoides involucran a diversas rutas metabólicas como la del ácido mevalónico (Figura 5) y la desoxixilulosa fosfato para la formación de los precursores IPP y DMAPP.

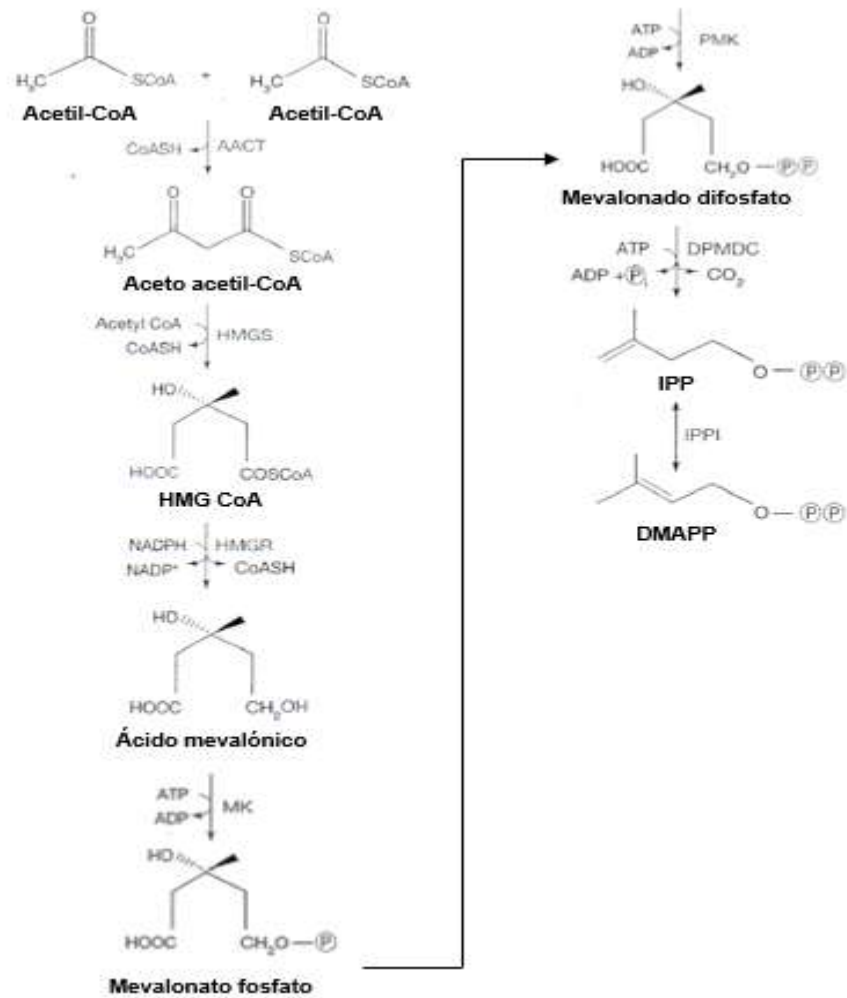
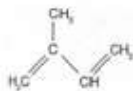


Figura 5. Ruta del ácido mevalónico (HMG: 3-hidroxi-3-metilglutarilo; IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil difosfato)

Función

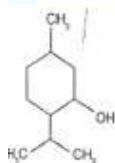
Las funciones de los terpenoides van desde formar parte del sistema cosechador de luz en la fotosíntesis, transporte de electrones, regulación del crecimiento de la planta y como compuestos volátiles tanto atrayentes como tóxicos en las interacciones animal-planta.

Hemiterpenos



Isopreno:
Desprendido como gas en árboles de conífera, puede ayudar en la protección contra estrés por calor

Monoterpenos



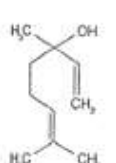
Mentol



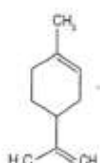
α -Pineno



β -Pineno



Linalol



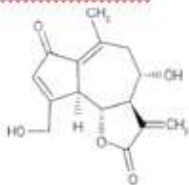
Limoneno



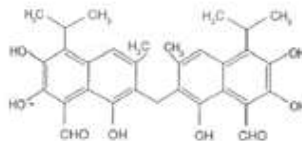
1,8-Cineol

Aceites volátiles importantes como aromas atrayentes o repelentes, la mayoría posee propiedades insecticidas

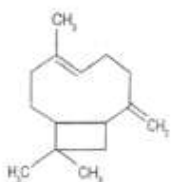
Sesquiterpenos



Lactucina:
Sabor amargo en la lechuga

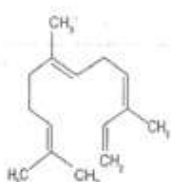


Gossipol:
Propiedades insecticidas, puede causar infertilidad debido a que afecta la espermatogénesis. Encontrado en semillas de algodón.



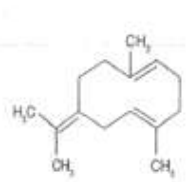
β -Cariofileno

Sabor amargo en la lechuga



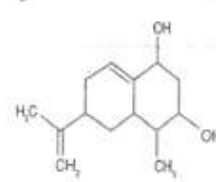
α -Farneseno

Compuesto con función de señal



Germacreno B

Compuesto con función de señal



Capsidiol

Fitoalexina

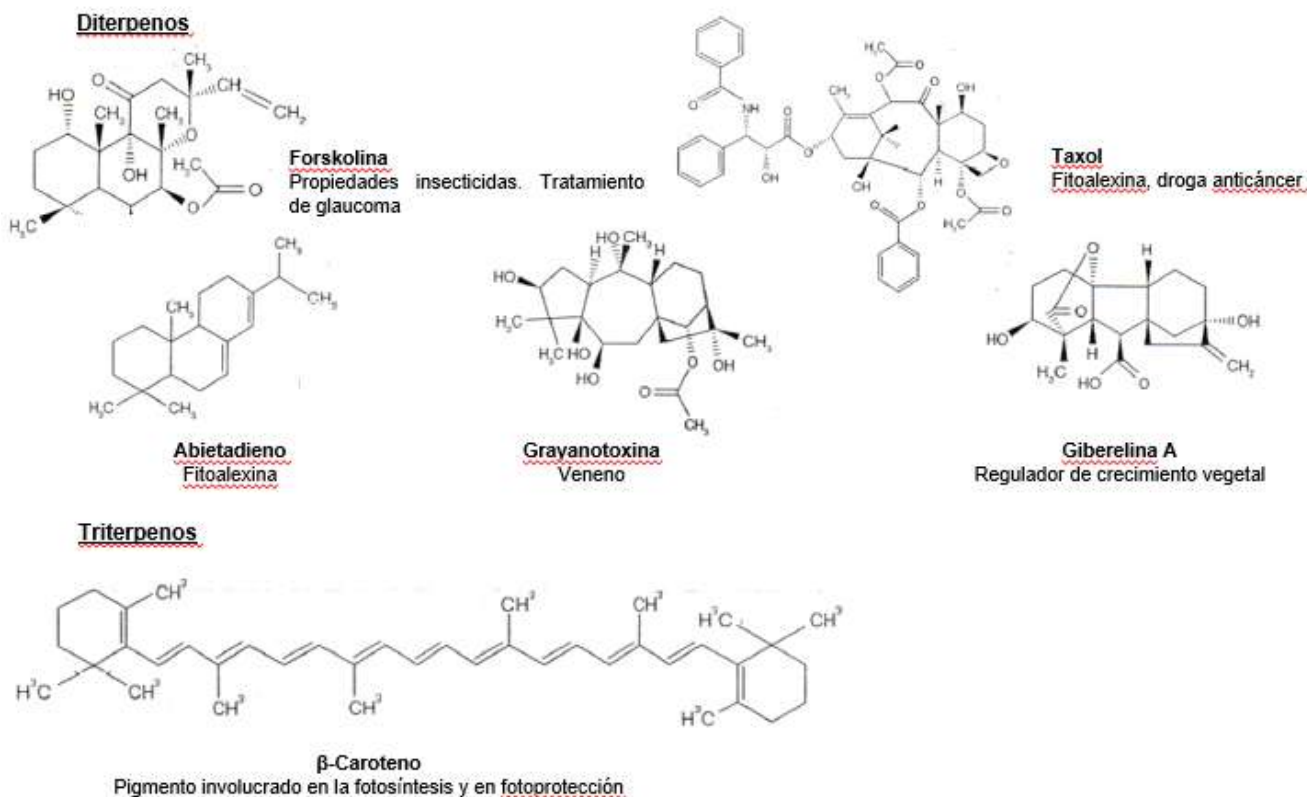


Figura 6. Ejemplos de estructuras terpenoides y su función

2.2.3. Polifenoles

Generalidades

Las plantas producen una gran variedad de compuestos fenólicos con diversas estructuras y propiedades. Cerca de 10,000 fenólicos diferentes han sido identificados; todos ellos tienen una componente en común, un anillo aromático hidrocarbonado (anillo de benceno o fenol) que usualmente se encuentra unido, al menos, a un grupo hidroxilo (Bowsher *et al.*, 2008). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que derivan de la ruta de las pentosas fosfato, del shikimato y de los fenilpropanoides en las plantas. (Randhir *et al.*, 2004). Estos compuestos se encuentran ubicuamente distribuidos en las plantas superiores demostrando un importante papel como defensa contra fitopatógenos, a la agresión de animales herbívoros, además de ser la respuesta que tiene la planta ante distintas condiciones de estrés abiótico como lluvia y radiación ultravioleta (Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Daglia, 2012).

Vistos desde un punto de vista estructural, en este grupo de compuestos se ubican un gran número de moléculas con estructura fenólica que pueden ser divididos de manera general en flavonoides y no flavonoides. La forma más simple de compuestos fenólicos es la propia molécula de fenol y sin embargo este compuesto nunca se encuentra libre en las plantas. Debido a que la mayoría de

los fenólicos son sintetizados a partir de productos de la ruta de los fenilpropanoides, estos compuestos son frecuentemente referidos como fenilpropanoides. La estructura básica de un fenilpropanoide es un anillo fenol unido a una cadena lateral de tres carbonos (C₆-C₃; Bowsher *et al.*, 2008). Por su parte, los flavonoides comparten un esqueleto carbonado común consistente en difenil propanos, dos anillos aromáticos (anillo A y B) unidos a una cadena lineal de tres carbonos; esta cadena central de tres carbonos forma un anillo de pirano (anillo C) con el anillo aromático A. En contraste, los principales grupos de compuestos no flavonoides son los ácidos fenólicos, que pueden ser subdivididos en derivados del ácido benzoico (Figura 7b) y derivados del ácido cinámico (Figura 7a); también son compuestos no flavonoides los estilbenos, representados por el resveratrol el cual existe en las dos formas isoméricas *cis* y *trans*, y los lignanos producidos por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano. Es importante destacar que además de esta diversidad estructural, los polifenoles se encuentran presentes en los tejidos vegetales principalmente en forma de glicósidos y/o asociados con ácidos orgánicos y/o como complejas moléculas poliméricas de alto peso molecular, como los taninos (Daglia, 2012).

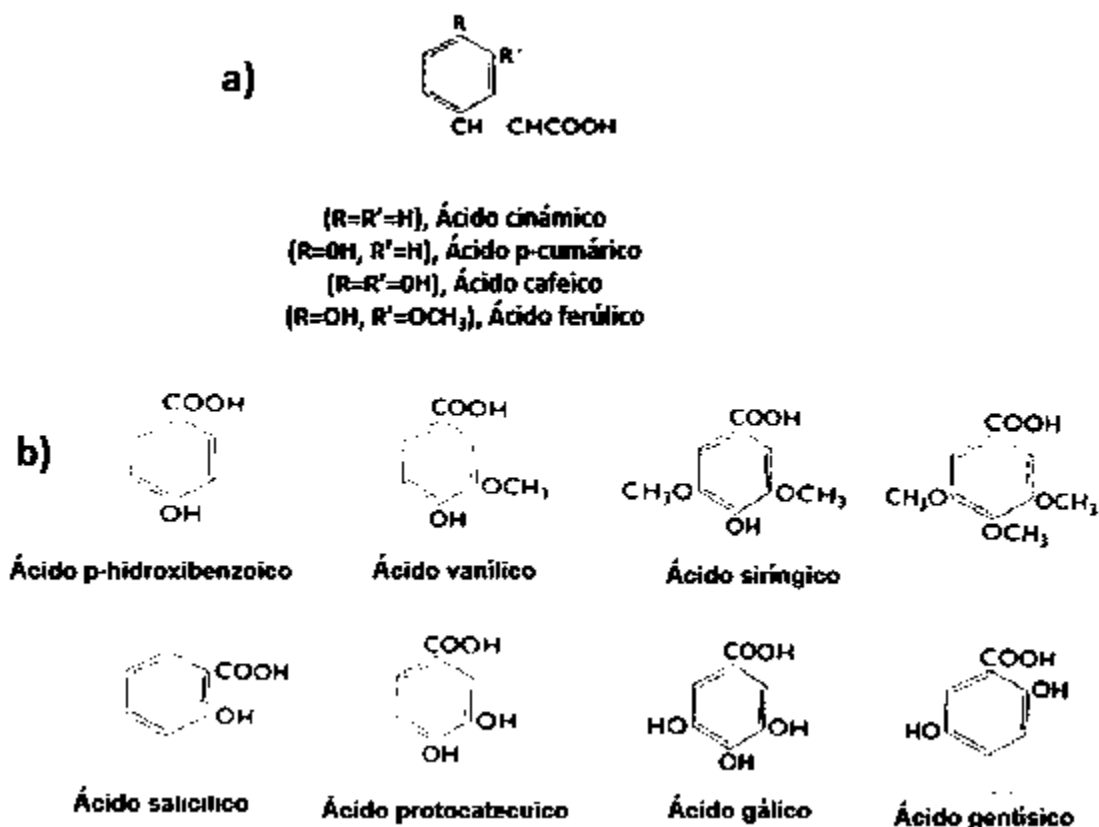


Figura 7. a) Derivados del ácido cinámico, b) derivados del ácido benzoico

Clasificación

Ácidos fenólicos: benzoicos y cinámicos

Dentro del grupo de los fenólicos simples se encuentran los fenilpropanoides simples, cumarinas, y derivados del ácido benzoico. Los fenilpropanoides simples comparten la estructura base compuesta por una cadena lateral de tres carbonos unida a un anillo fenólico de 6 carbonos; su síntesis se muestra en la Figura 8. La cadena lateral es lineal y resulta importante resaltar que estos compuestos son las unidades centrales a partir de los cuales se forman prácticamente todos los compuestos fenólicos restantes.

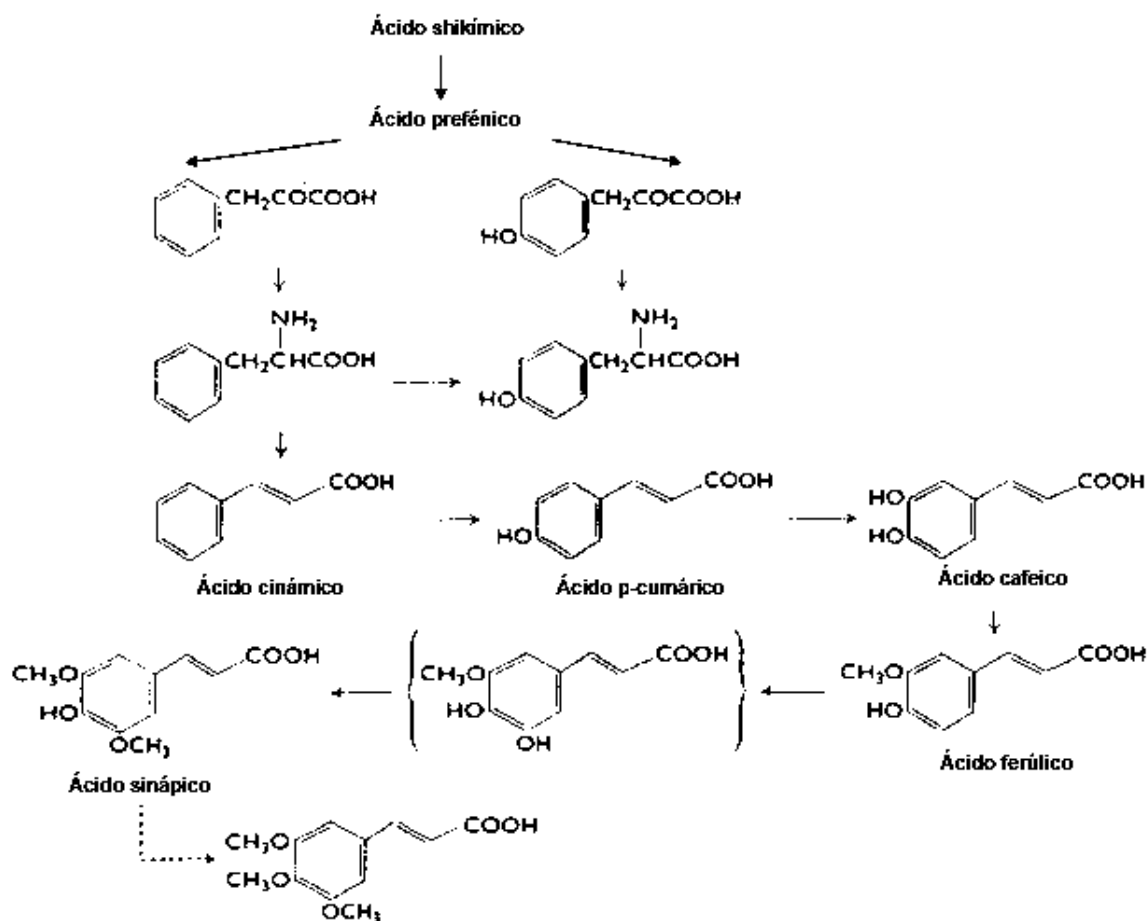


Figura 8. Síntesis de fenilpropanoides simples (ácidos cinámicos) a partir del ácido shikímico

Ácido cafeico, ferúlico, cinámico y p-cumárico son ejemplos de fenilpropanoides sencillos, y son sintetizados directamente por acción de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y/o tirosina amonio liasa (TAL), como se observa en la Figura 9.

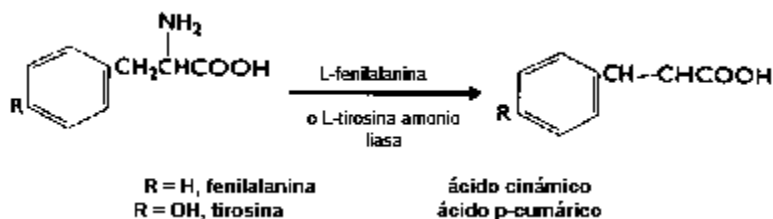


Figura 9. Formación de ácidos cinámicos a partir de aminoácidos aromáticos

Los ácidos cinámicos obtenidos por la acción de las amonio liasas constituyen el punto de inicio a partir del cual un gran número de procesos del metabolismo secundario comienzan. La mayoría de los compuestos pertenecientes a este grupo se encuentran como ésteres de azúcares y de ácido quínico, como es el caso del ácido clorogénico (Figura 10).

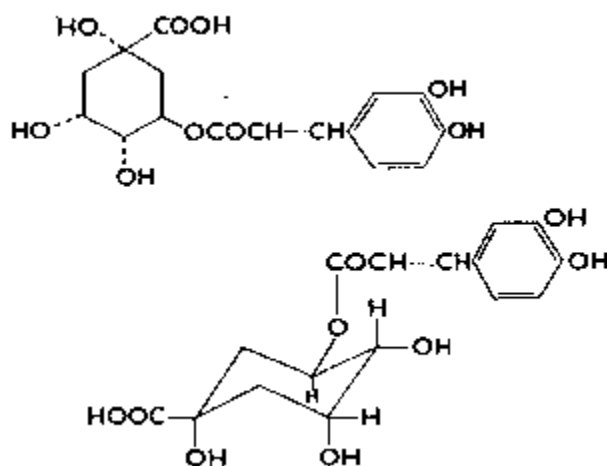


Figura 10. Estructura química del ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquínico)

Las cumarinas poseen el mismo esqueleto estructural básico antes mencionado, diferenciándose en que la cadena lateral está ciclada de manera que forma otro anillo, consecuentemente también se clasifican como lactonas fenilpropanoides. Cumarina, umbeliferona, esculetina y escopoletina son ejemplos de este tipo de compuestos; también existen subgrupos, tal es el caso de las furanocumarinas las cuales contienen una anillo de furano como cadena lateral unido al anillo fenólico central.

El tercer grupo de fenólicos sencillos son los derivados del ácido benzoico. Estos compuestos difieren del resto dado que poseen una estructura C₆-C₁ en lugar de C₆-C₃. Ejemplos de ellos son la vanilina y el ácido salicílico, así como el ácido

gálico el cual es el componente principal de los taninos hidrolizables (Bowsher *et al.*, 2008).

Flavonoides

Más de 4000 flavonoides han sido identificados en frutos, vegetales y bebidas derivadas de vegetales, como el té y el vino. Dependiendo del estado de oxidación del anillo central de pirano, los flavonoides pueden subdividirse en numerosas subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanoles e isoflavonas (Daglia, 2012).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores, siendo las rutáceas, poligonáceas, compuestas y umbelíferas, las principales familias que los contienen. Abundan, sobretodo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis. Estos compuestos son importantes para la planta, al igual que ocurre con la mayor parte de los metabolitos secundarios, porque además de ser responsables de la coloración de muchas flores, frutos y hojas, intervienen en la polinización atrayendo a los insectos, tienen actividad para controlar radicales libres, etc.

Son heterósidos solubles en agua caliente, alcohol y solventes orgánicos polares, siendo insolubles en los apolares. Sin embargo, cuando están en estado libre son poco solubles en agua, pero son solubles en solventes orgánicos relativamente oxigenados, dependiendo de su polaridad. Por otro lado, son sustancias fácilmente oxidables y, por tanto, tienen efecto antioxidante (López-Luengo, 2002).

Los flavonoides son un grupo amplio de compuestos muy diversos con más de 6000 tipos ya conocidos; poseen funciones biológicas como pigmentos, venenos, antibióticos, etc. Todos los flavonoides poseen el mismo esqueleto estructural básico, el cual consiste en dos anillos de 6 carbonos (anillo A y anillo B) unidos mediando un anillo de tres carbonos (anillo C; Figura 11). Modificaciones estructurales en estos tres anillos, particularmente el grado de oxidación del anillo C, son la base de una clasificación más detallada de los flavonoides formando diversos grupos químicos que son chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianinas, así como los polímeros de flavonoides flobafenos y proantocianidinas (taninos condensados). Las chalconas se distinguen del resto de los flavonoides por poseer el anillo C abierto, mientras que las flavanonas son isómeros de las chalconas con la diferencia de presentar el anillo C en forma cerrada al igual que el resto de los flavonoides. Las flavonas difieren de las flavanonas por poseer una doble ligadura carbono-carbono dentro del anillo C; las flavonas son isómeros de las isoflavonas, cuya principal diferencia es la posición del anillo B. En las flavonas, al igual que en otros flavonoides, el anillo B se encuentra unido al anillo C en la posición C-2; en las isoflavonas, el anillo B se une

al anillo C en posición C-3. Los flavonoles difieren de las flavonas por poseer grupos hidroxilo en la posición C-3 del anillo C (Bowsher *et al.*, 2008).

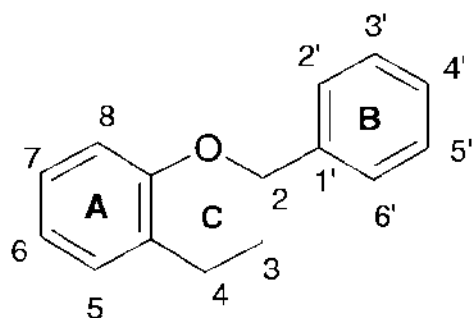


Figura 11. Estructura genérica de una molécula flavonoide (Balasundram *et al.*, 2006)

La mayoría de los flavonoides se encuentran en la naturaleza como glicósidos, molécula de aglicona unida a uno o más residuos de carbohidratos. En la Figura 12 se muestra la estructura general de estas moléculas.

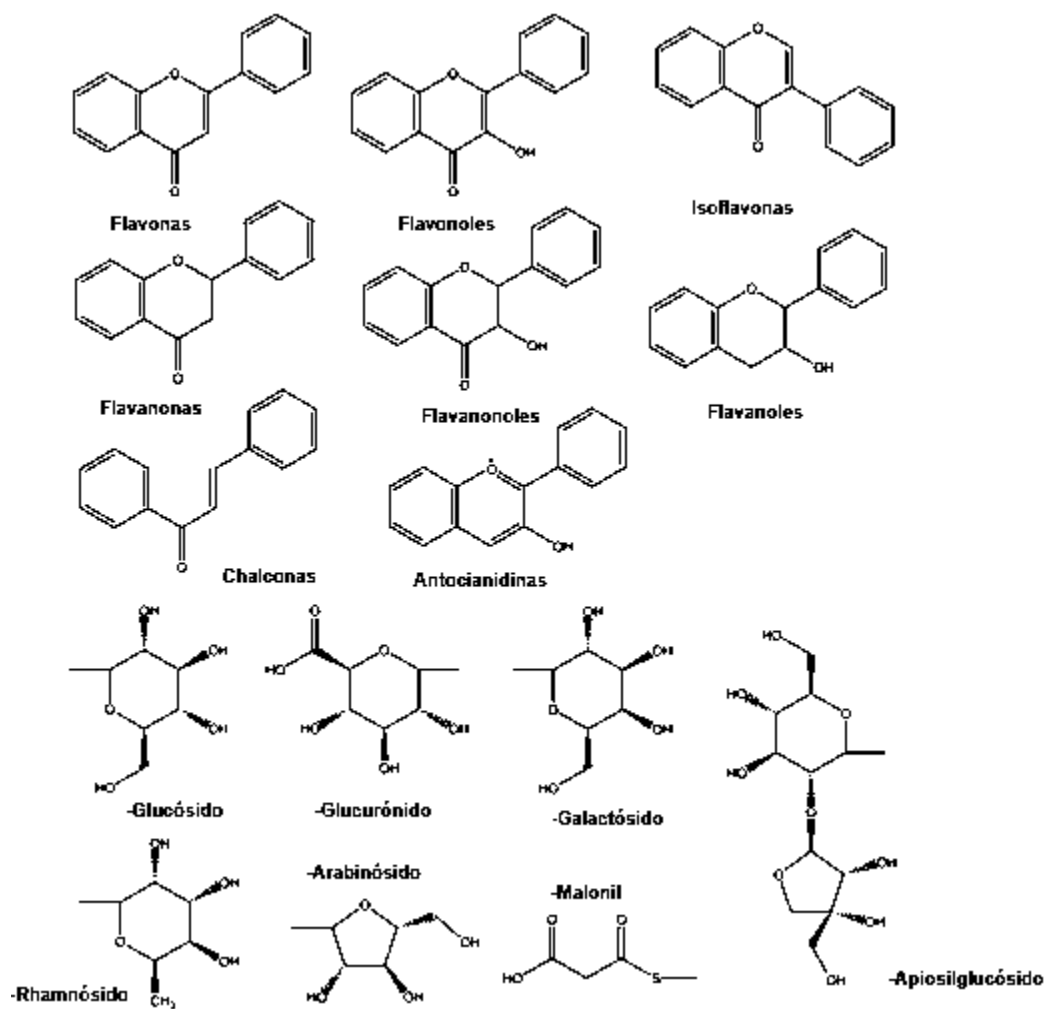


Figura 12. Estructura química de los principales grupos/subgrupos flavonoides y sus glicósidos asociados (Huang et al., 2010)

Los grupos de flavonoides pueden polimerizarse para formar proantocianidinas, las cuales están formados por flavan-3-oles, (+)-catequina y (-)-epicatequina, incluidos ambos estereoisómeros y se unen por enlaces interflavano. Este enlace se forma usualmente en la posición 4 de la unidad superior y en la posición 8 de la unidad inferior. Pueden presentarse de dos a 50 unidades de flavan-3-oles; la estructura varía de acuerdo al tipo de flavan-3-oles presentes, la posición de los enlaces entre ellos y el grado de hidroxilación de las subunidades. En casos raros, pueden existir componentes distintos en el polímero; el ácido gálico, por ejemplo, se encuentra frecuentemente incorporado entre las unidades de flavan-3-oles en las proantocianidinas de la semilla de uva (Bowsher *et al.*, 2008)

Flavonas

Las flavonas contienen un enlace doble entre las posiciones C2 y C3 en el anillo C y una cetona en la posición C4. La mayoría de las flavonas de frutas y hortalizas tienen un grupo hidroxilo en la posición C5 del anillo A, mientras que la hidroxilación en otras posiciones, más a menudo en la posición C7 del anillo A o posiciones C3 y C4 del anillo B, puede variar en función de la clasificación taxonómica de una fruta o verdura en particular. Las agliconas flavona más generalizadas son apigenina y luteolina, sin embargo los diversos patrones de sustitución hacen a este grupo más grande, con 309 agliconas (Valant-Vetschera *et al.*, 2006). La glicosilación de estos compuestos se produce principalmente en las posiciones C5 y C7, mientras que la metilación y acilación de grupos hidroxilo en el anillo B (Williams, 2006).

Isoflavonoides

Los isoflavonoides son sintetizados a través de una serie de reacciones que derivan de la ruta de los flavonoides, presentándose únicamente en miembros de la familia Leguminosae; estos compuestos se encuentran principalmente en la subfamilia Papilionoideae la cual incluye legumbres comerciales como frijol, chícharo, soya y alfalfa. Los isoflavonoides poseen diversas funciones, tales como antimicrobiano (fitoalexina), compuestos de defensa contra insectos e inductores de los genes de nodulación en las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Rhizobium* (Bowsher *et al.*, 2008).

Los compuestos isoflavonoides poseen un esqueleto flavonoide con una distribución distinta al resto de las moléculas que forman a este grupo, donde el anillo G se encuentra unido en posición 3- al anillo central. Diversas modificaciones en la estructura base de los isoflavonoides (Figura 13) dan lugar a una larga variedad de compuestos incluyendo isoflavonas, 3-arilcumarinas, rotenona y sus derivados, etc. (Geissman y Gourt, 1969).

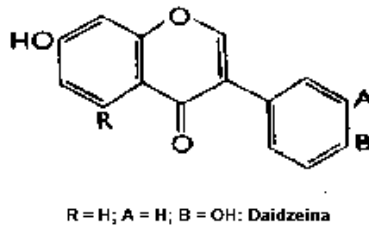


Figura 13. Ejemplo de la estructura química de un isoflavonoide

Flavonoles

Los flavonoles tienen una única diferencia con las flavonas, un grupo hidroxilo en la posición C3; es en ese grupo donde puede haber frecuentemente glicosilaciones. De la misma manera que las flavonas, las agliconas de los flavonoles son muy diversas en los patrones de hidroxilación y metilación; por lo tanto, cuando los patrones de glicosilación son considerados, los flavonoles son quizás el subgrupo más numeroso. Las agliconas flavonoles más comunes son quercetina y kaempferol (Williams, 2006).

Auronas

Una clase de compuestos flavonoides menormente distribuidos en la naturaleza comparados con los grupos derivados del flavano son las auronas, también conocidas como 2-benzalcumaran-3-onas, representadas por la sulfuretina. Estas moléculas se encuentran acompañadas en sus fuentes naturales por chalconas, esto debido a que las auronas son formadas directamente por una simple oxidación en un anillo de las chalconas (Geissman y Gourt, 1969). Las auronas se encuentran en un limitado número de especies vegetales donde las flores poseen color amarillo, destacando los miembros de la familia Scrophulariaceae y Compositae. La conversión de chalcona a aurona requiere de una hidroxilación en el anillo B y/o una ciclación oxidativa para finalmente obtener la estructura de una aurona (Figura 14; Bowsher *et al.*, 2008).

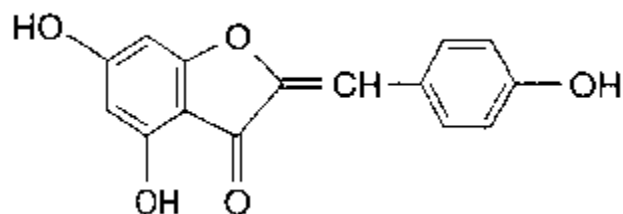
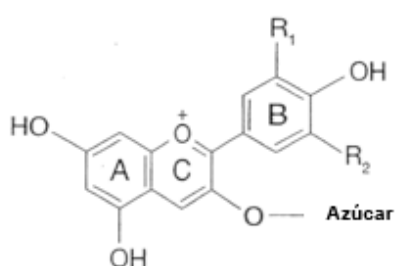


Figura 14. Estructura química de una aurona

Antocianinas

Las antocianinas son aceptadas generalmente como el más importante grupo de pigmentos hidrosolubles en plantas; son las responsables de brindar color azul, morado y rojo, así como los tonos intermedios, en los tejidos vegetales. Su tonalidad y estructura dependen del pH y de la presencia de copigmentos. Son glicósidos de antocianidinas (flavonoides) con un esqueleto C6-C3-C6 (Figura 15); las agliconas (estructura química desprovista del fragmento de azúcar) raramente se encuentran en material vegetal fresco.



Antocianina	R ₁	R ₂	Azúcar
Cianindina-3-O-β-D-glucósido	OH	H	Glucosa
Definidina-3-O-β-D-glucósido	OH	OH	Glucosa
Pelargonidina-3-O-β-D-glucósido	H	H	Glucosa
Malvidina-3-O-β-D-glucósido	OCH ₃	OCH ₃	Glucosa
Petunidina-3-O-β-D-glucósido	OH	OCH ₃	Glucosa

Figura 15. Estructura general de las antocianinas y ejemplos de ellas (Bowsher et al. 2008)

Son compuestos sumamente inestables, particularmente cuando se les remueve de su ambiente nativo y de la protección que les brinda el fenómeno de copigmentación; la remoción del azúcar ubicado en la posición C3 por hidrólisis ácida o enzimática desestabiliza al pigmento, debido a que la estructura resultante (chalcona) se degrada rápidamente a derivados del ácido benzoico (Clifford, 2000).

Estilbenos

Los estilbenos, aunque no son miembros del grupo de los flavonoides, su síntesis comparte precursores utilizados en la ruta de síntesis de flavonoides: p-cumaroil CoA y malonil CoA (Figura 16). Estos compuestos son estructuralmente caracterizados por la presencia de un núcleo 1,2-difeniletileno con grupos hidroxilo como sustituyentes en los anillos aromáticos, existiendo en forma de monómeros u oligómeros. La molécula más representativa de este grupo de metabolitos secundarios es el *trans*-resveratrol, el cual posee un esqueleto trihidroxiestilbeno (Han et al., 2007).

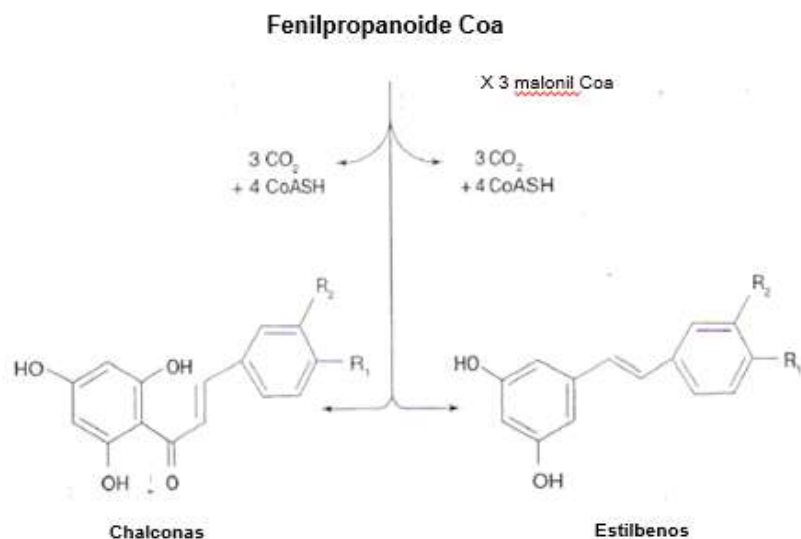


Figura 16. Síntesis de estilbenos a partir de los precursores de flavonoides

Los estilbenos se encuentran en briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas. Más de 300 diferentes tipos han sido identificados, sin embargo aún se sabe muy poco sobre su producción, más allá de la reacción inicial catalizada por la estilbeno sintasa. Las moléculas del tipo estilbeno son importantes compuestos de defensa en las plantas, mostrando propiedades antifúngicas y antibacterianas. La estilbeno sintasa es inducida por el ataque de un patógeno resultando en un incremento en la producción de estilbenos como una respuesta sistémica de defensa. Es por ello que los agricultores han puesto su interés en los cultivos ricos en estilbenos con la finalidad de aprovechar y mejorar su resistencia a patógenos fúngicos. Adicionalmente, el resveratrol presente en vinos se ha convertido en un atractivo comercial debido sus propiedades cardioprotectoras y anticancerígenas (Bowsheer *et al.*, 2008).

Lignanós

Los lignanos son dímeros u oligómeros de monolignoles, como el coniferil alcohol, presentando importantes funciones defensivas para las plantas como agentes antimicrobianos (Bowsher *et al.*, 2008).

Existen diversos reportes sobre el efecto benéfico de los grupos hidroxilo en los lignanos sobre la actividad antioxidante y anticancerígena de este tipo de moléculas, aunque la mayoría de los lignanos no exhiben una fuerte actividad para bloquear radicales libres. Por otro lado, también ha sido reportado que los lignanos podrían tener propiedades antiinflamatorias, antibacteriales, antivirales, antiangiogénicas y antimutagénicas; regulan la expresión de enzimas, rutas de transducción de señales y metabolismo hormonal, entre muchas otras funciones (Huang *et al.*, 2010)

Taninos

Son compuestos de peso molecular relativamente alto que constituyen el tercer grupo en importancia de los fenólicos en las plantas y que puede ser subdivididos en taninos condensados e hidrolizables. Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas, son polímeros de polihidroxiflavan-3-oles mientras que los hidrolizables son ésteres de ácido gálico o elágico, galotaninos o elagitaninos (Balasundram *et al.*, 2006).

Taninos hidrolizables

En las plantas, el ácido elágico se presenta como compuestos libre, en forma acilada o glicosilada, o como elagitanino usualmente esterificado con glucosa. En las frambuesas, el ácido elágico libre constituye la menor proporción del contenido total en ácido elágico (Määttä-Riihinen *et al.*, 2004). Los taninos hidrolizables son metabolitos secundarios presentes en muy variadas familias del reino vegetal. Se caracterizan por su solubilidad en agua y masas moleculares entre 500 y 5000 u; están formados por ésteres de ácido gálico, glucosa y productos de sus reacciones de oxidación (Figura 18). Dentro de los taninos hidrolizables, los galotaninos se hidrolizan liberando ácido gálico (Negri y Tabach, 2013) mientras que los elagitaninos pueden ser hidrolizados con ácidos o bases para liberar unidades hexahidroxidifenilo, las cuales espontáneamente forman ácido elágico (Bobinaité *et al.*, 2012). La distribución de los galotaninos es limitada en la naturaleza, mientras que los elagitaninos están ampliamente distribuidos en las plantas (Negri y Tabach, 2013).

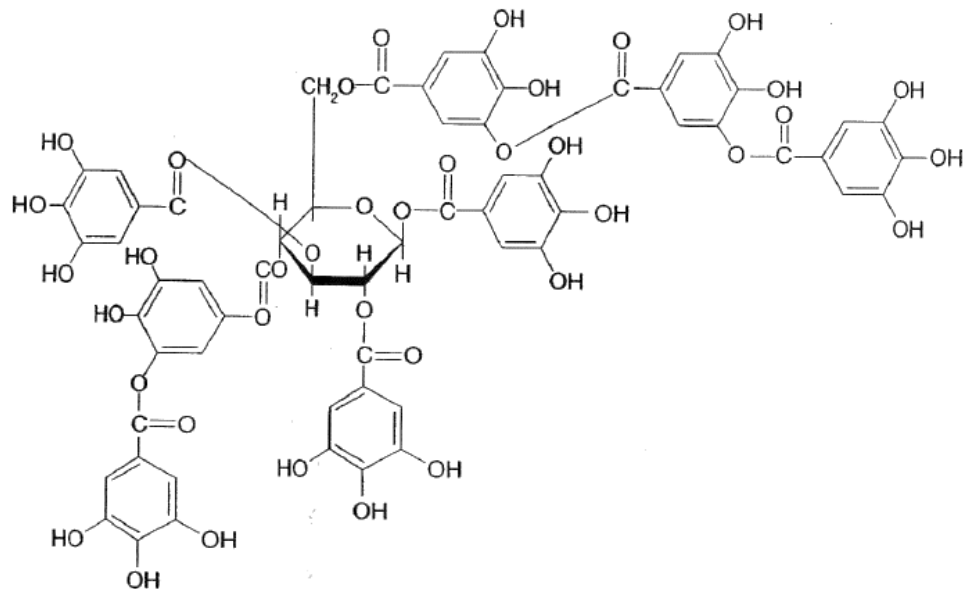


Figura 17. Estructura de un tanino hidrolizable (Taiz y Zeiger, 2006)

Taninos condensados o proantocianidinas

Los taninos condensados (también conocidos como proantocianidinas) son derivados de catequina y ésteres de ácido gálico con ácido quínico (Arapitsas, 2012). Son el segundo más grande grupo de polifenoles, después de las ligninas, que se encuentran en plantas leñosas y en algunas herbáceas. También pueden describirse como oligómeros o polímeros de hidroxiflavanol o flavan-3-oles, que producen antocianidinas por rompimiento del enlace interflavano C-C (Figura 19); los monómeros más comunes que constituyen a este tipo de compuestos son catequina, galocatequina, afzelequina, epicatequina, epigalocatequina y epiafzelequina (Ferreira *et al.*, 2006).

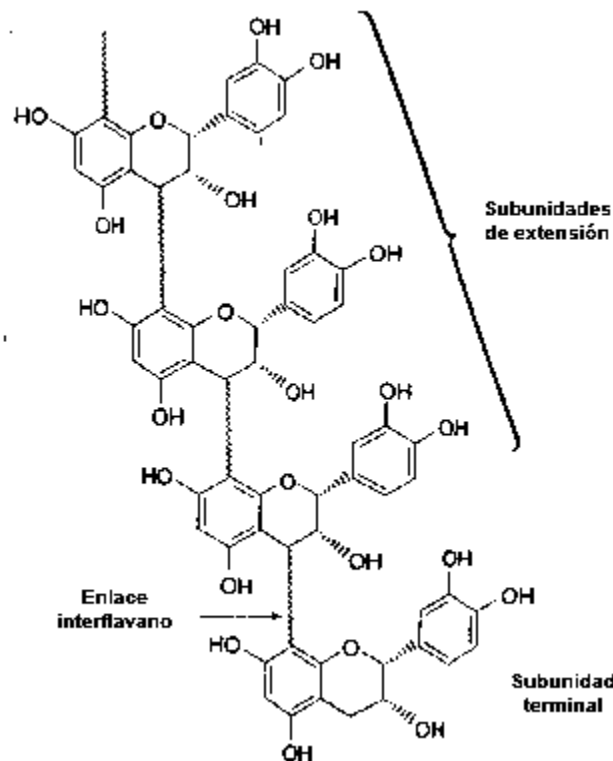


Figura 18. Estructura de un tanino condensado (Taiz y Zeiger, 2006)

Cuando los monómeros se unen por enlaces sencillos entre los carbonos en las posiciones 4,6 o 4,8, se tienen taninos condensados del tipo B, y cuando hay un enlace adicional en posición C2-C7 o enlace éter C2-O, forman los del tipo A. El grado de polimerización varía desde los dímeros hasta los polímeros de hasta 200 unidades monoméricas (Serrano *et al.*, 2009).

Biosíntesis

Para abordar la biosíntesis de los compuestos polifenólicos, se generalizará la formación de los compuestos flavonoides, considerando que para el resto de compuestos fenólicos existen rutas metabólicas adicionales.

La estructura básica C6-C3-C6 común para todos los flavonoides es derivada de dos rutas separadas. La ruta de los fenilpropanoides, a través del ácido shikímico, provee la molécula p-cumaroil CoA, la cual constituye la base para la síntesis del anillo B, así como para la construcción de la estructura de 3 carbonos que constituye al anillo C. La ruta del acetato/ácido malónico proporciona 3 moléculas de malonil CoA que se condensan para formar el anillo A de 6 carbonos (Figura 20).

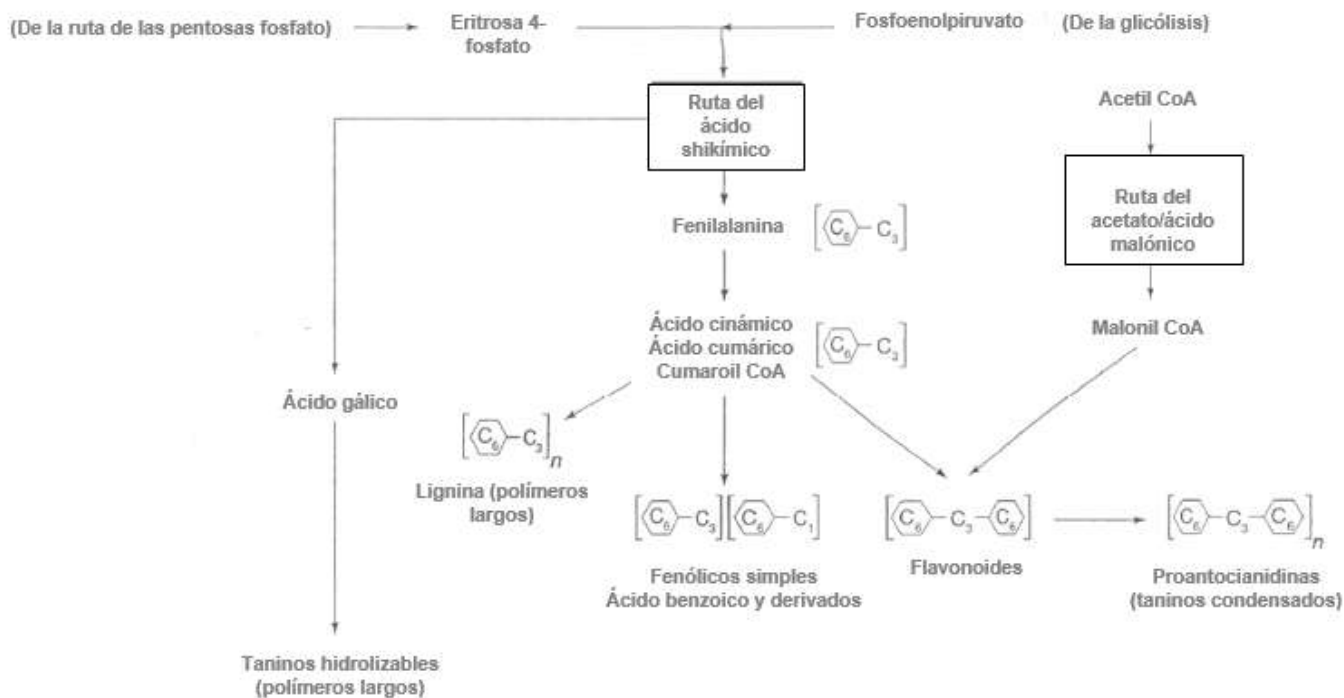


Figura 19. Esquema general de rutas implicadas en la producción de los compuestos fenólicos principales en plantas (Bowsher et al., 2008)

Así, la estructura flavonoide de 3 anillos se establece en la primera reacción de la ruta de biosíntesis, donde las 3 moléculas de malonil CoA se condensan con la molécula de p-cumaroil CoA para formar una chalcona, reacción catalizada por la chalcona sintasa. En este paso, también puede actuar la enzima estilbeno sintasa para la formación de los estilbenos, compuestos que comparten los mismos precursores de las chalconas. Una vez que la chalcona es formada, sirve como precursor de los distintos tipos de flavonoides (Bowsher et al., 2008). En la Figura 21 se esquematizan las reacciones biosintéticas a partir de la fenilalanina hasta la formación de la chalcona.

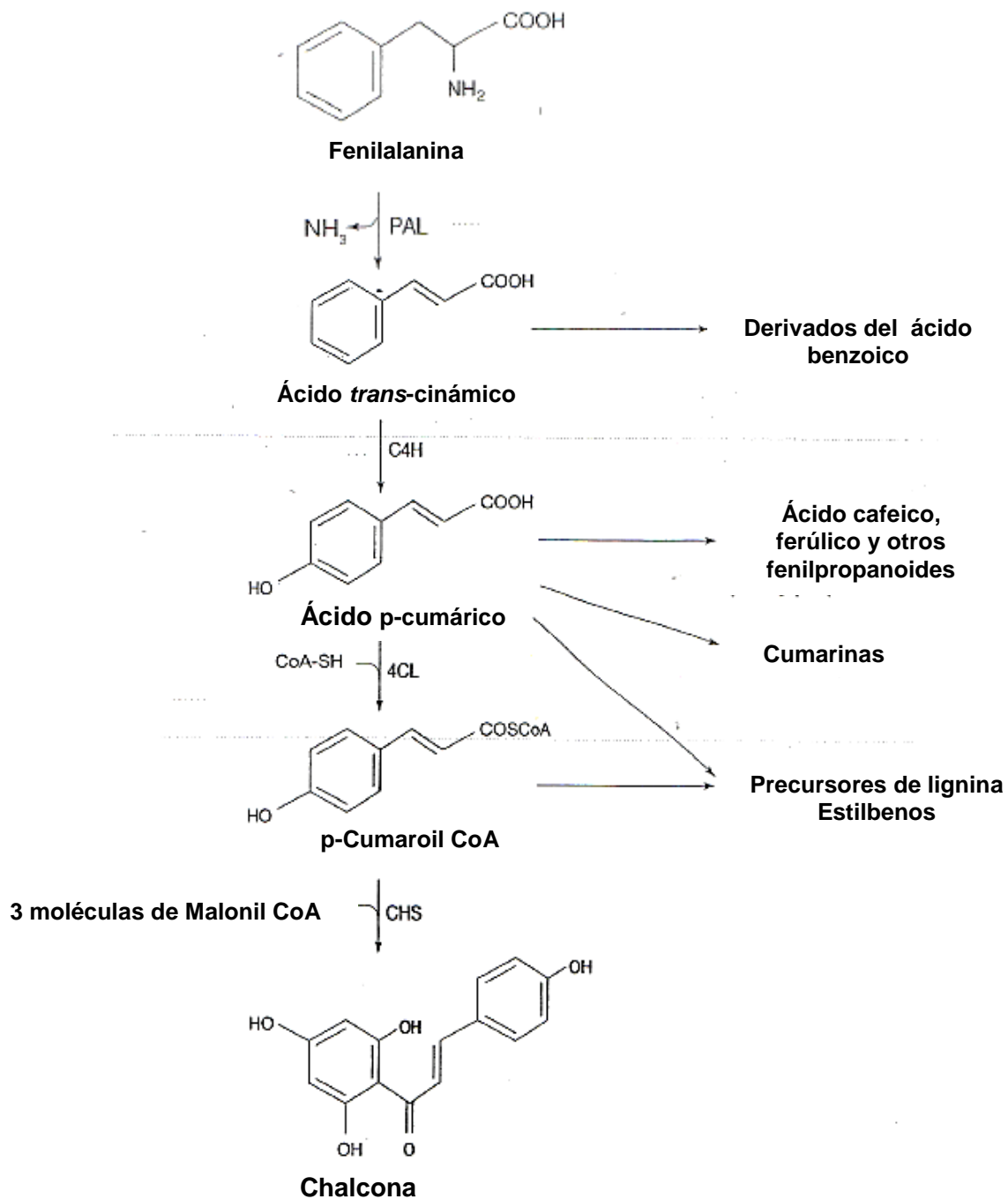


Figura 20. Biosíntesis de chalcona a partir de fanilalanina (Bowsher et al., 2008)

Características estructurales de los compuestos derivados del ácido shikímico

El ácido shikímico es reconocido como un compuesto que constituye el punto de inicio para un importante arreglo de compuestos que existen naturalmente y pertenecientes a distintas clases. Este ácido es un metabolito universal de las plantas superiores y de distintos organismos no mamíferos; es el precursor de la mayoría de los compuestos de las plantas que poseen un anillo aromático y que no son sintetizadas por la ruta del acetato.

Para reconocer los compuestos aromáticos sintetizados por la vía del ácido shikímico existe un patrón de hidroxilación del anillo aromático:

- En los compuestos derivados del acetato, los grupos OH fenólicos se encuentran característicamente en posición meta; es decir, son compuestos derivados del resorcinol o floroglucinol.

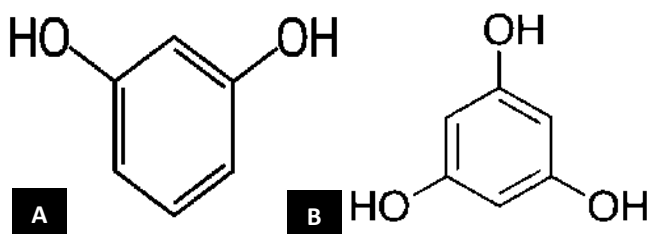
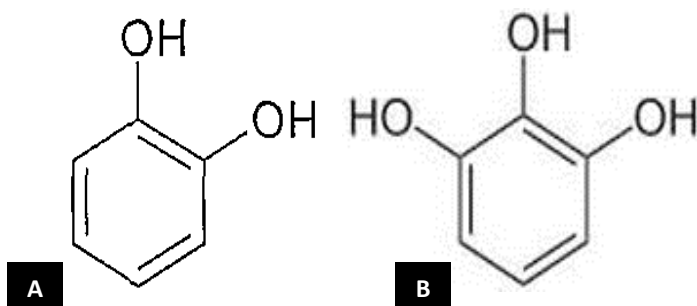


Figura 21. Estructura química del A) Resorcinol, B) Floroglucinol

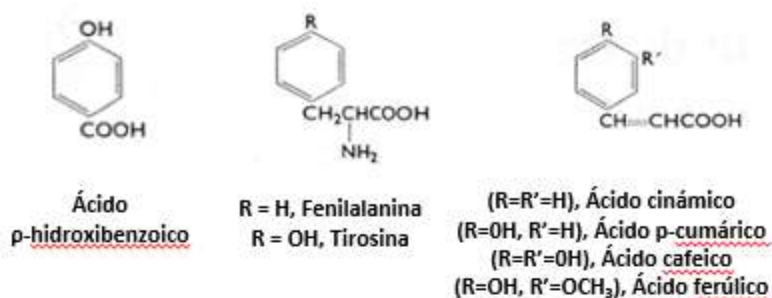
- En compuestos aromáticos derivados del ácido shikímico, el patrón de disposición de los grupos OH en el anillo corresponde al que se observa en



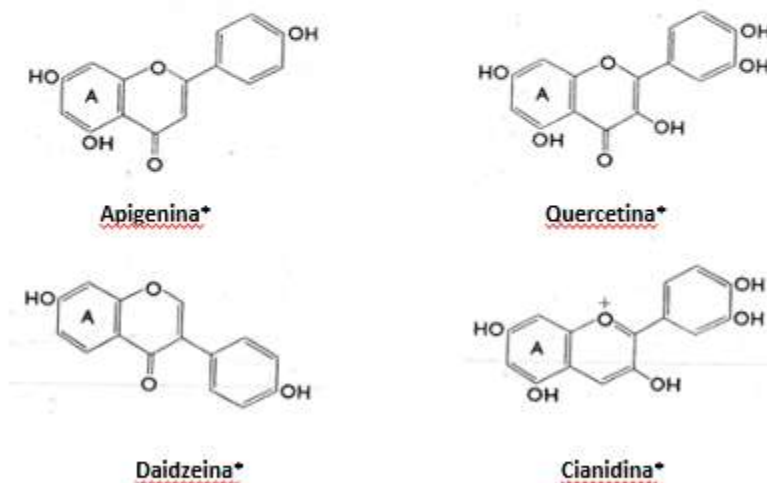
las estructuras del catecol y pirogalol.

Figura 22. Estructura química del A) Catecol, B) Pirogalol

En la Figura 22 se muestran compuestos derivados del ácido shikímico, incluyendo ejemplos que abarcan desde compuestos simples derivados del benceno hasta compuestos del tipo “grupo arilo-C-C-C”. Es importante notar que todos estos compuestos poseen una unidad C₆-C-C-C, o como derivados de ellos mediante la pérdida o adición de átomos de carbono.



Compuestos con un sólo anillo aromático



**Anillo A derivado de la ruta del acetato. Estos compuestos se presentan en la naturaleza casi siempre como alicósidos*

Figura 23. Algunos compuestos representativos derivados de ácido shikímico

Biosíntesis del ácido shikímico

La formación del ácido shikímico proviene de los precursores de 3 y 4 carbonos ácido fosfoenolpirúvico y eritrosa-4-fosfato, a través de una serie de pasos que se muestran en el siguiente esquema.

Ruta del ácido shikímico

Los sustratos iniciales en la ruta del ácido shikímico se forman por la ruptura de carbohidrato; la eritrosa-4-fosfato es un producto de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, mientras que el fosfoenolpiruvato es producido en la glucólisis.

Las primeras 7 reacciones de la ruta del ácido shikímico llevan a la formación del ácido corísmico, el cual es generalmente considerando como el paso final de esta ruta. Sin embargo, el subsecuente metabolismo del ácido corísmico para formación la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, ha sido incluido en esta ruta considerándose como un paso esencial que conlleva a la síntesis de los fenilpropanoides. Esta ruta metabólica (Figura 26a y 26b) se encuentra en plantas, hongos y bacterias, no así en animales, quienes deben ingerir a través de su dieta los aminoácidos aromáticos (Bowsher *et al.*, 2008).

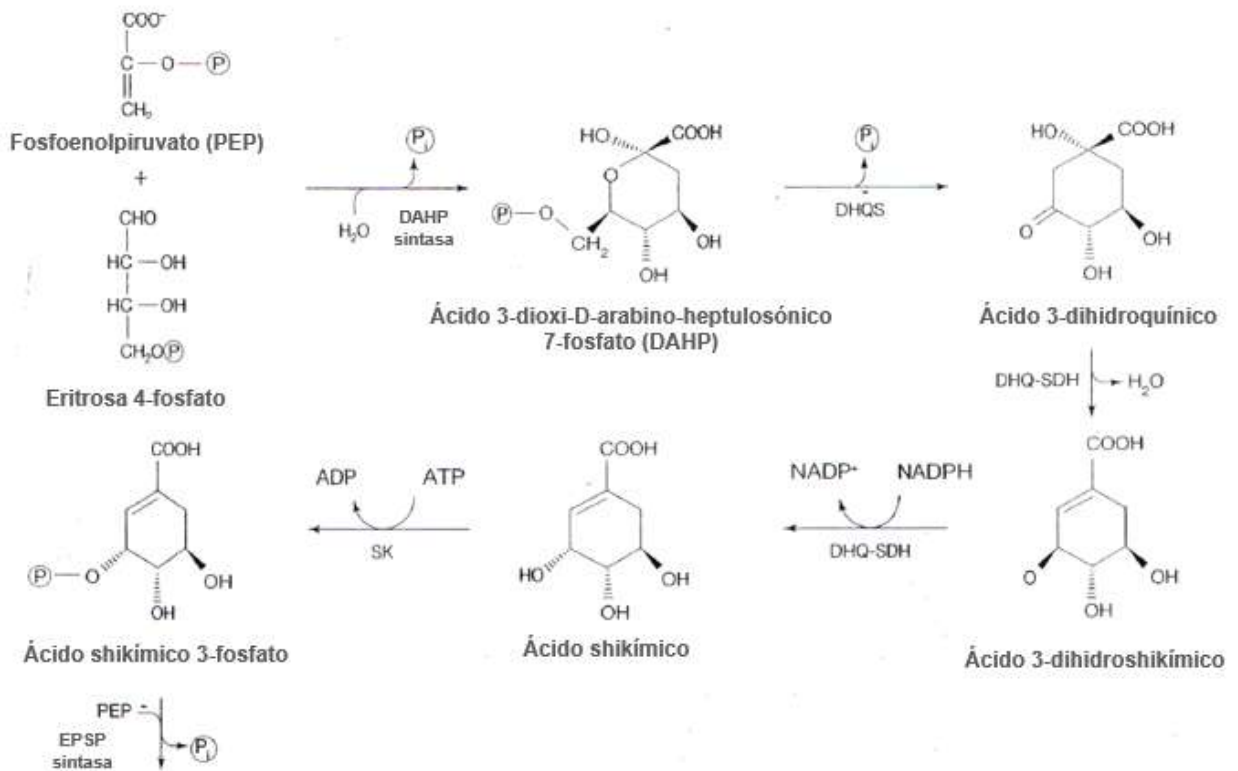


Figura 25a. Ruta del ácido shikímico, parte 1

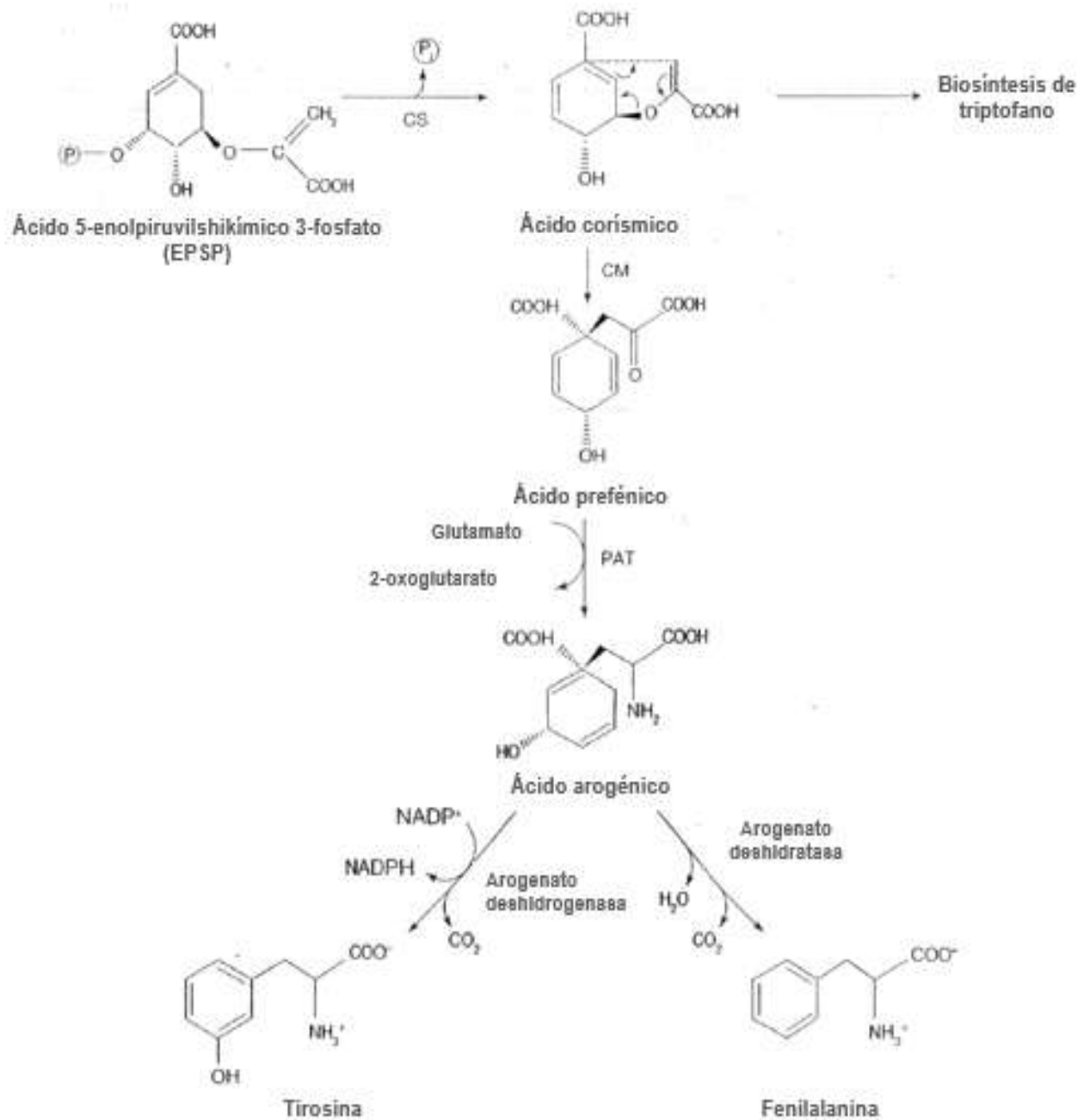


Figura 26b. Ruta del ácido shikímico, parte 2

La biosíntesis de los distintos tipos de compuestos fenólicos se da por una serie de rutas metabólicas con numerosas ramificaciones, cuyo esquema general se muestra en la Figura 27.

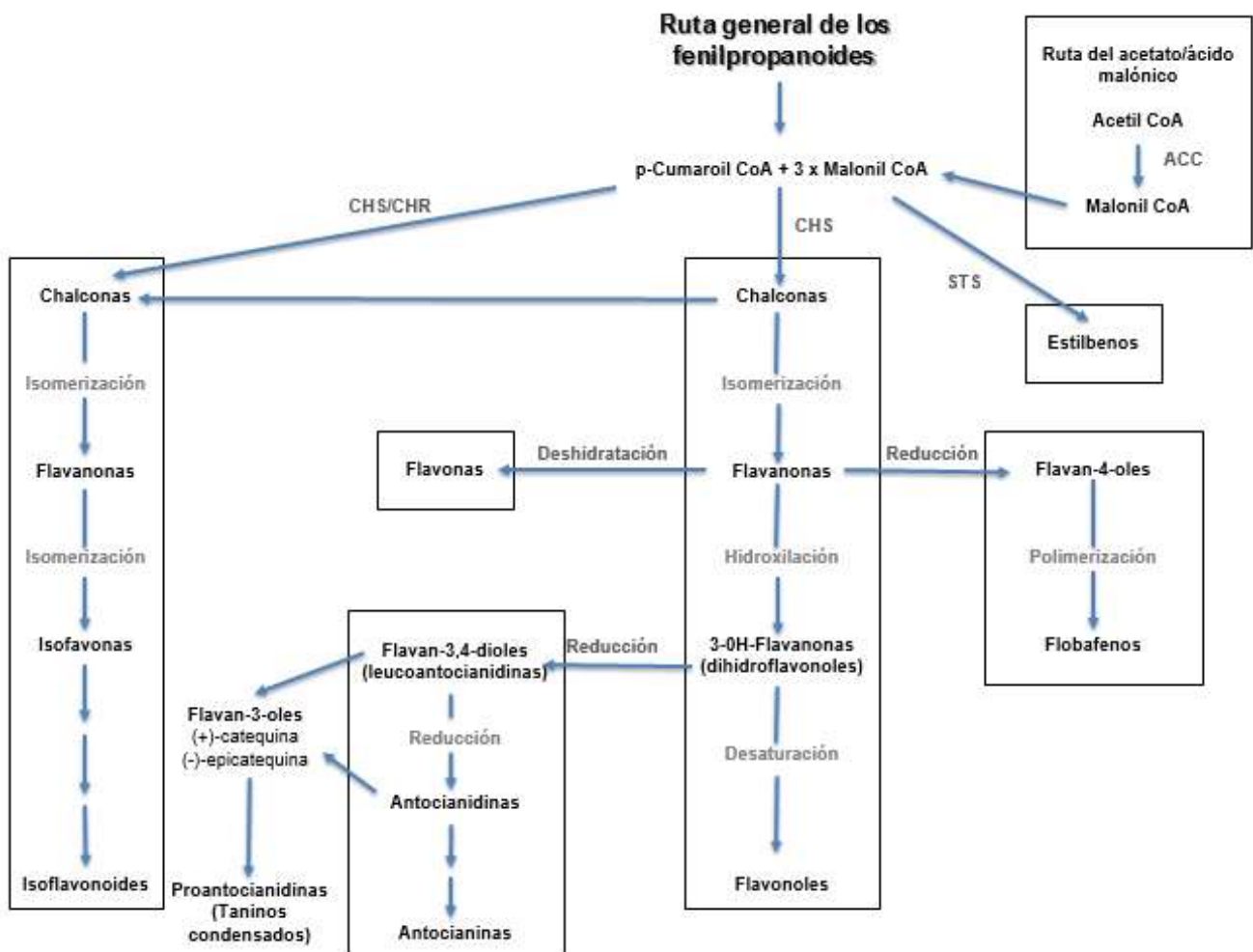


Figura 26. Rutas y ramificaciones en la biosíntesis de los principales grupos de flavonoides. (CHS/CHR, chalcona sintasa/chalcona reductasa; ACC, acetil CoA carboxilasa; STS, estilbeno sintasa)

Función

En plantas

Las funciones biológicas de los fenólicos en las plantas son muchas y muy variadas: aromas y pigmentos, venenos y barreras contra herbívoros, compuestos alelopáticos, moléculas señal, componentes estructurales y agentes antimicrobianos. Estos compuestos se agrupan en diferentes clases dependiendo de su estructura básica; los grupos más abundantes en las plantas son fenólicos simples, flavonoides, lignanos y taninos (Bowsher *et al.*, 2008).

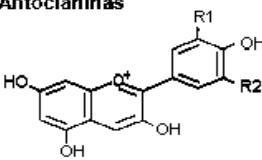
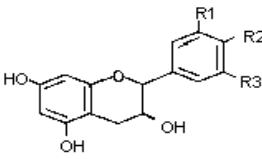
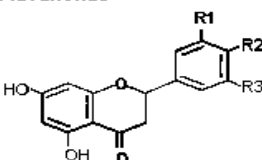
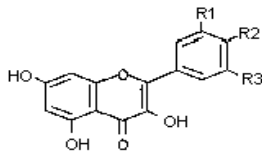
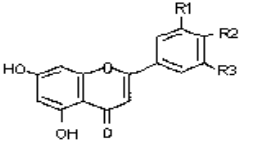
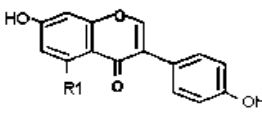
Los polifenoles son esenciales para una amplia gama de funciones en las plantas. Por ejemplo, estos compuestos proveen coloración a flores, frutos y semillas, logrando la atracción de los polinizadores y dispersores de semillas; promueven la fertilidad de la planta y la germinación del polen; actúan como moléculas señal en las interacciones planta-microorganismo; protegen a la planta contra el daño por luz ultravioleta, además de poseer otras funciones defensivas (Petti y Scully, 2009).

En humanos

En los últimos 20 años, los polifenoles han sido extensamente estudiados debido a su potencial para la prevención de enfermedades crónicas, tales como cáncer, osteoporosis, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Su actividad protectora ha sido atribuida, inicialmente, a sus propiedades como antioxidantes, barrera de radicales libres y quelantes de metales; posteriormente, sus efectos fueron explicados gracias a su capacidad para inhibir diferentes enzimas, tales como la telomerasa (Naasani *et al.*, 2003), ciclooxigenasa (O'Leary *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2005; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010) y lipooxigenasa (Schewe *et al.*, 2001; Sadik *et al.*, 2003). Más recientemente se explica que las funciones de los compuestos polifenólicos son debidos a la interacción de éstos en rutas de transducción de señales y receptores celulares (Kong *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2003).

Los efectos benéficos para la salud más significativos exhibidos por frutillas como la zarzamora son atribuidos a los compuestos fenólicos, como los flavonoides, ácidos fenólicos y taninos (Paredes-López *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Ejemplos de compuestos flavonoides, fuente alimenticia y sus efectos biológicos

Flavonoides	Subclase de flavonoides	Alimentos que los contienen	Efectos biológicos
<p>Antocianinas</p> 	<p>R1=R2=H: Pelargonidina R1=OH; R2=H: Cianidina R1=R2=OH: Delfinidina R1=OCH3; R2=OH: Petunidina R1=R2=OCH3: Malvidina</p>	<p>Moras rojas y azules, uvas, vino tinto</p>	<p>Antioxidante, Antiinflamatorias, Antihipertensivos, Neuroprotectores, Inhibe peroxidación lipídica, Antidiabéticos</p>
<p>Flavanoles</p> 	<p>R1=R2=OH; R3=H: Catequina R1=R2=R3=OH: Galocatequina</p>	<p>Té verde, chocolate, uvas, moras, manzana, té negro y Oolong, Chocolate, uvas rojas, moras, vino tinto</p>	<p>Antioxidante, Antiproliferativos, Prevención de enfermedades cardiovasculares y cerebro vasculares, Anticancerígenos Antidiabéticos</p>
<p>Flavanonas</p> 	<p>R3=H; R2=OH: Naringenina R3=R2=OH: Quercetina R1=OH; R2= OCH3: Hesperidina</p>	<p>Cítricos, jugos</p>	<p>Antiproliferativas, Antiinflamatorias, Disminución de adhesión de moléculas</p>
<p>Flavonoles</p> 	<p>R2=OH; R1=R3=H: Kaempferol R1=R2=OH; R3=H: Quercetina R1=R2=R3=OH: Miricetina</p>	<p>Cebollas amarillas, cebolletas, col, brócoli, manzana, moras, té</p>	<p>Antioxidante, Prevención de enfermedades cardiovasculares y cerebro vasculares Anticancerígenos</p>
<p>Flavonas</p> 	<p>R1=H; R2=OH: Apigenina R1=R2=OH: Luteolina</p>	<p>Perejil, tomillo, apio, chiles</p>	<p>Antiproliferativos, Anticancerígenos, Antiinflamatorias,</p>
<p>Isoflavonas</p> 	<p>R1=H: Diadzeina R1=OH: Genisteina</p>	<p>Frijol de soya, alimentos a base de soya, legumbres</p>	<p>Propiedades estrogénicas, Anticancerígenos, Antiproliferativas Inhibe peroxidación lipídica</p>

Fuente: Duthie *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2007

Actividad antimicrobiana

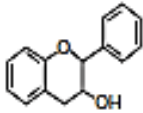
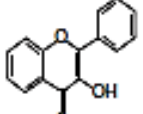
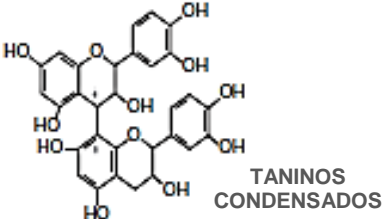
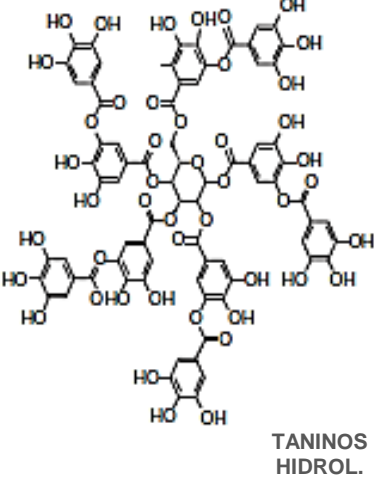
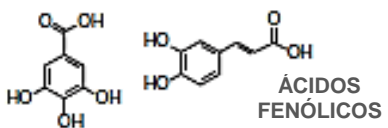
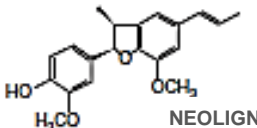
La era antimicrobiana se encuentra amenazada por diversos factores, entre los que destacan los altos niveles de resistencia a antibióticos exhibida por distintos microorganismos, el limitado número y disponibilidad de antibióticos efectivos contra diversas especies bacterianas, así como el reducido compromiso de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos antiinfectivos. Por ejemplo, para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas, particularmente infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), la vancomicina ha sido extensamente utilizada como agente antimicrobiano para su control debido a su seguridad, durabilidad contra la resistencia de la bacteria y por la falta de otras alternativas de tratamiento aprobadas. Sin embargo, la eficacia y seguridad de la vancomicina para el tratamiento de numerosas infecciones serias ha encontrado fuertes cuestionamientos (Song, 2008). Todo lo anteriormente mencionado, así como los elevados costos derivados de infecciones prolongadas, manifiesta la imperante necesidad de obtener nuevos agentes antimicrobianos para el control y tratamiento de patógenos de humanos que no son susceptibles a los antibióticos actualmente disponibles (Rice, 2003; Wenzel, 2004); estas medidas deben ser coordinadas con agresivos esfuerzos para mitigar las infecciones, así también con el uso racional de los agentes antiinfectivos disponibles y los nuevos que sean desarrollados (Rice, 2003). En este sentido, el potencial terapéutico de los fitoquímicos ha sido reconocido, considerando así a las plantas como un fuente que acumula potentes drogas antiinfectivas (Gibbons, 2004; Mahady, 2005), incluso para microorganismos resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados para su control.

Hamill y colaboradores, en 2003, reportaron la evaluación del potencial antimicrobiano de dos fracciones obtenidas a partir de extractos crudos de *Rubus apetalus*, la cual es conocida por su uso como droga en herbolaria tradicional en el sur de Uganda. Los investigadores observaron dicho potencial en ensayos contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Candida albicans* (MIC= 62 µg/mL, 16 µg/mL y 32 µg/mL, respectivamente). Por otro lado, Zapata y colaboradores reportaron en el mismo año la evaluación de extractos etanólicos obtenidos de tallos de Cardón de Lefaria, desgrasados y no desgrasados, en su efecto sobre el desarrollo *in vitro* de 10 hongos fitopatógenos, encontrando un efecto significativo sobre el desarrollo micelial en todos los hongos evaluados, principalmente *Phytophthora infestans* y *Sclerotium rolfsii*, reduciendo hasta en un 94 % su crecimiento micelial. Adicionalmente, realizaron una determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, indicando la presencia de aceites esenciales, polifenoles, taninos y saponinas. A pesar de lo anteriormente mencionado, aún se encuentran pocos trabajos sobre evaluaciones

de productos naturales y sus propiedades biológicas que pongan de manifiesto su potencial para el control de fitopatógenos.

De la misma manera, se han llevado a cabo algunos trabajos para evaluar la actividad inhibitoria de patógenos exhibida por extractos de *Rubus ulmifolius*, así como por moléculas que de ella han sido aisladas; tal es el caso de Sisti y colaboradores, quiénes en 2007 reportaron diversos grados de sensibilidad tras realizar una prueba antifúngica usando extractos metanólicos obtenidos a partir de brotes *Rubus*. Así mismo, Quave y colaboradores, reportaron en 2012 la actividad del ácido elágico extraído de las raíces de *R. ulmifolius* en la inhibición de la formación de un biofilm de *Staphylococcus aureus*, usando concentraciones muy por debajo de las requeridas para que pueda efectuarse el desarrollo microbiano; además, lo anteriormente mencionado fue correlacionado con el incremento de la susceptibilidad de células blanco a los antibióticos daptomicina, dindamicina y oxacilina. Paralelamente, ha sido evaluada la bioactividad de otras especies, como *Rubus urticaefolius*, donde los extractos hidroalcohólicos obtenidos de hoja, tallo y fruto, tanto frescos como secos, produjeron halos de inhibición en cultivos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Finalmente, Barbosa y colaboradores, en 2006, llevaron a cabo un ensayo usando extractos metanólicos de *Rubus coriifolius*, logrando la inhibición de *Giardia lamblia*.

Cuadro 4. Estructura química de algunas clases de polifenoles y microorganismos sensibles a ellos

 <p>FLAVAN-3-OLES</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p><i>V.cholerae</i> - <i>S.mutans</i> - <i>C.jejuni</i> <i>C.perfringens</i> - <i>E.coli</i> - <i>B.Cereus</i> <i>H.pylori</i> - <i>S.aureus</i> - <i>L.acidophilus</i> <i>A.nesiundii</i> - <i>Poralis</i> - <i>P.gingivalis</i> <i>P.melaninogenica</i> - <i>F.nucleatum</i> - <i>C.pneumonia</i></p>
 <p>FLAVONOLES</p>	<p>ANTIVIRAL</p> <p><i>Adenovirus</i> - <i>Enterovirus</i> - <i>Flu virus</i></p> <p>ANTIFÚNGICO</p> <p><i>Candida albicans</i> <i>Micrasporum gypsum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i></p>
 <p>TANINOS CONDENSADOS</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p><i>S.mutans</i> <i>E.coli</i> <i>S.aureus</i></p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>influenza A virus type -1 herpes simplex virus (HSV)</p>
 <p>TANINOS HIDROL.</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>Diferent strains of : <i>Salmonella</i> - <i>Staphylococcus</i> <i>Helicobacter</i> - <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i> <i>Listeria</i></p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>Epstein-Barr virus Herpes virus HSV -1 and HSV -2,</p> <p>ANTIFÚNGICO</p> <p><i>Candida parapsilosis</i></p>
 <p>ÁCIDOS FENÓLICOS</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p><i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i> <i>E.coli</i> - <i>Paeruginosa</i></p>
 <p>NEOLIGNANOS</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>Diferent strains of : <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>

Extracción

Diferentes solventes han sido usados para la extracción de polifenoles a partir de material vegetal. La concentración y la actividad antioxidante, de extractos naturales dependen del solvente utilizado; por ejemplo, el agua es un mejor solvente para la extracción de catequinas comparada con metanol al 80 % y etanol al 70 %. Así también distintos procedimientos han sido propuestos, tal es el caso de las extracciones mediante grasas y aceites, solventes orgánicos, soluciones alcalinas acuosas y con CO₂ supercrítico; las mezclas acuosas de etanol, metanol y acetona son las más utilizadas (Hayouni *et al.*, 2007). En este contexto el método de extracción de fenólicos a partir de un material vegetal usado como sustrato y el método ideal de extracción para clases particulares de compuestos de este tipo, deberán ser individualmente diseñado y optimizado (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2013).

Proestos y Komaitis (2008) realizaron la extracción de polifenoles por el método tradicional de reflujo con solventes y proponen la extracción rápida asistida por microondas, además de comparar cuatro mezclas de solventes distintas: a) metanol-agua 60: 40 v/v, b) acetona-agua 60:40 v/v; c) agua y d) acetato de etilo-agua 60:30 v/v), utilizando 6 diferentes plantas aromáticas de Grecia. En todos los casos, el agua resultó ser el extractante que permitió obtener una cantidad más elevada de polifenoles totales en todas la plantas evaluadas; por ejemplo, para *Styrax officinalis* se registró la mayor concentración en el extracto acuoso, 20.1 ±0.4 mg AG/g p.s., mientras que con el sistema de extracción d) sólo se obtuvieron 4.8 ± 0.1 mg AG/g p.s., mediante el método de reflujo y sin diferencias significativas respecto a la extracción asistida por microondas.

Cuantificación

El método más utilizado para la cuantificación de polifenoles contempla el uso del reactivo de Folin-Cioacaltea (RFC) como agente oxidante y la posterior neutralización con una sal, generalmente Na₂CO₃. Sin embargo, las especificaciones sobre volúmenes de reacción, cantidad de muestra, concentración de reactivos y expresión de resultados son sumamente variables en los reportes existentes. En el Cuadro 5. se muestran algunos ejemplos de protocolos seguidos para la cuantificación de compuestos polifenólicos obtenidos a partir de distintas fuentes vegetales.

Cuadro 5. Protocolos para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

Fuente de polifenoles	Mezcla de reacción	Expresión de resultados	Referencia
<i>Rubus ulmifolius</i> <i>Sambucus nigra</i> L. (semillas)	100 µL muestra 1 mL *RFC ¹ 800 µL Na ₂ CO ₃ 10%	mg **EAG/g de extracto	Fazio <i>et al.</i> , 2013
<i>Vitis vinífera</i> L. <i>Vaccinium myrtillus</i> L. <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait. <i>Prunus cerasus</i> L. etc. (jugos)	0.5 mL muestra 2.5 mL RFC ¹ 2 mL Na ₂ CO ₃ 7.5 %	mg EAG/100 mL de jugo	Díaz-García <i>et al.</i> , 2013
<i>Fragaria chiloensis</i> ssp. <i>chiloensis</i> f. <i>chiloensis</i> (frutos, hojas y rizomas)	NE	g EAG/100 g p.s. ²	Simirgiotis <i>et al.</i> , 2010
<i>Rubus glaucus</i> Beth (frutos)	20 µL muestra 1.58 mL agua 100 µL RFC 300 µL Na ₂ CO ₃ 20 %	mg EAG/100 g p.f. ³	Garzón <i>et al.</i> , 2009
Híbridos de <i>Rubus</i> L. (frutos)	0.5 mL muestra 7.5 mL agua desionizada 0.5 mL RFC 3 mL Na ₂ CO ₃ 20 %	mg EAG/100 g p.f.	Siriwoharn <i>et al.</i> , 2004

*Reactivo de Folin-Ciocalteu. **Equivalentes de Ácido Gálico. ¹Dilución de RFC/agua 1:10 v/v. ²en peso seco. ³en peso fresco. NE: volúmenes y concentraciones no especificados.

Las condiciones de incubación de la reacción colorimétrica con el RFC así como las longitudes de onda empleadas en espectrofotómetro UV-Vis para la lectura de la absorbancia que permita la posterior expresión de los resultados a través de la construcción de curvas estándar de compuestos de referencia son igualmente variables; se han reportado tiempos de incubación de la reacción de oxidación provocada por el RFC de 1, 4, 5, 8, 10, etc., minutos a temperatura ambiente, tiempos de neutralización de la reacción con Na₂CO₃ de 5 min a 50 °C, 10 min a 40 °C, 10, 30, 120, minutos a temperatura ambiente, etc.; longitudes de onda de 700, 750, 755, 765 nm, etc. (Siriwoharn *et al.*, 2004; Mertz *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009; Simirgiotis *et al.*, 2010; Çekiç y Özgen, 2010; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Díaz-García *et al.*, 2013; Fazio *et al.*, 2013).

Si bien el método de Folin-Ciocalteu ha sido extensamente utilizado para la cuantificación de polifenoles totales, recientemente se han establecido evaluaciones a través del uso de técnicas analíticas instrumentales; tal es el caso

de Díaz-García *et al.*, en 2013, quiénes reportaron las condiciones para la cuantificación de polifenoles individuales en jugos de diversos frutos, como uva, manzana, arándano rojo, etc., mediante UHPLC con detector de fluorescencia (Fluo) y de arreglo de fotodiodos (PDA, por sus siglas en inglés) comparando con estándares comerciales como referencia. En este trabajo se correlacionó el contenido de polifenoles totales obtenido por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu y por UHPLC-PDA-Fluo encontrando un factor de correlación de 0.9661, esto cuando se sustrajo la concentración de ácido ascórbico del total de polifenoles reportado a través de la técnica colorimétrica. Lo anterior indica que el método tradicional proporciona resultados confiables sobre el contenido de compuestos polifenólicos siempre y cuando sean consideradas las posibles interferencias que eleven los valores, como distintos compuestos que podrían igualmente oxidarse con el reactivo de Folin-Ciocalteu y ser detectados a la misma longitud de onda empleada en el análisis. En este sentido, el método instrumental UHPLC-PDA-Fluo proporciona resultados certeros de compuestos individuales sin ser afectados por interferencias de otros compuestos, además de obtener su identificación gracias a los estándares empleados; en conclusión, esta técnica permite la identificación y cuantificación simultánea de los polifenoles. Sin embargo, el aspecto económico deberá ser considerado para la selección de la técnica de cuantificación, en concordancia con el objetivo del análisis y la naturaleza de las muestras.

2.2.4. Biopesticidas

Los biopesticidas son compuestos derivados de materiales naturales como animales, plantas, bacterias y algunos minerales; usualmente son biodegradables en cortos periodos de tiempo. Las plantas, fuente más común de biopesticidas, producen una gran variedad de metabolitos secundarios que aparentemente no poseen una función directa en procesos fisiológicos y bioquímicos en el propio organismo que los produce (Kessler y Balwin, 2002). Algunos de estos compuestos pueden ser usados como “moléculas guía” en el desarrollo de agentes protectores contra insectos y hongos; por tal razón, existe un creciente interés para la aplicación de metabolitos secundarios en el manejo integrado de plagas, lo cual ha conllevado a la búsqueda de nuevas fuentes de productos biológicamente activos, con nuevos modos de acción (Conner *et al.*, 2000; Céspedes *et al.*, 2014). En este contexto terpenos, fenólicos y otros compuestos que se acumulan en las partes aéreas de las plantas, principalmente en las hojas y tricomas, son considerados como biopesticidas únicos (Céspedes *et al.*, 2013a y b; Muñoz *et al.*, 2013a y b).

Cuando se habla de biopesticidas es inevitable considerar una de las principales razones que impulsaron su búsqueda y explotación: compuestos orgánicos

contaminantes y persistentes; éstos son mayoritariamente de origen sintético y han sido extensamente aplicados provocando un fuerte impacto negativo en el medio ambiente, además de la aparición de cepas microbianas resistentes. Para contrarrestar estos efectos negativos, moléculas orgánicas de origen botánico podrían ofrecer una fuente más segura y eficiente de compuestos para el manejo de plagas debido a que son ambientalmente amigables (Kubo, 1997).

Las características sobresalientes de los biopesticidas de origen vegetal es su baja toxicidad en mamíferos, limitada persistencia en el medio ambiente y mayor biodegradabilidad que los compuestos sintéticos; el uso de metabolitos secundarios en el manejo integral de plagas ha generado una búsqueda intensiva de nuevas fuentes de compuestos que cumplan con las características anteriormente mencionadas (Akhtar *et al.*, 2008, 2012; González y Estevez-Braun, 1998; Isman, 2006).

2.3. Bacterias fitopatógenas

2.3.1. *Pantoea stewartii*

El género *Pantoea* es un género ubicuo de bacterias epífitas de plantas que pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae. Mientras que algunas especies son estudiadas para su comercialización por su capacidad en el control biológico, hay otras que se destacan por su virulencia o el daño que generan en cultivos de interés agronómico (Rezzonico *et al.*, 2010).

Tal es el caso de la bacteria *Pantoea stewartii*, organismo Gram negativo, móvil, de pigmentación amarilla y anaerobio facultativo. Su principal hospedero es el maíz, causando la marchitez de Stewart en el maíz dulce y en algunas líneas de maíz susceptible al ataque por la bacteria.

La marchitez de Stewart es la enfermedad bacteriana más grave de maíz dulce en los EE.UU. El impacto económico es mínimo en los campos sembrados con variedades resistentes. Sin embargo las medidas que se toman para controlar el daño son costosas, como los inmunoensayos, ligados a enzimas (ELISA), deben llevarse a cabo para certificar que la semilla de maíz con destino a los mercados de exportación estén libre de *P. stewartii* subsp. *stewartii* (Michener *et al.*, 2002). Por esta razón, la mayoría de semillas de maíz se producen en lugares en los que no se produce el marchitamiento de Stewart. Además, hay restricciones de cuarentena colocados sobre *P. stewartii* subsp. *stewartii* para evitar la introducción de la bacteria en las zonas en las que no ocurre.

El control de la marchitez de Stewart se basa en gran medida en la generación de cultivares híbridos resistentes. Gran parte del maíz comercial producido ha sido criado para la resistencia a la marchitez de Stewart. Como parte de los criterios para la selección de variedades se muestran niveles adecuados de resistencia que previenen la infección sistémica (Pataky *et al.*, 2008). Sin embargo, todavía hay

algunos híbridos de maíz dulce y líneas consanguíneas de élite utilizadas para la producción de semilla de maíz híbrido que quedan muy susceptibles a la marchitez de Stewart. De ahí la importancia de buscar otras alternativas para el control de la infección, como el uso de extractos vegetales para el control del desarrollo bacteriano.

III. JUSTIFICACIÓN

La planta de zarzamora es reconocida por diversas propiedades entre las que destaca su potencial antimicrobiano; respecto a este potencial, los reportes existentes son escasos y sólo se han evaluado menos de 10 especies silvestres del género *Rubus*, además dichas evaluaciones se han enfocado al estudio de la susceptibilidad de patógenos de humanos, dejando de lado casi por completo a los fitopatógenos.

Por otro lado, de manera tradicional el control de plagas y enfermedades en cultivos de importancia económica se ha realizado mediante la utilización desmedida de agroquímicos, los cuales han causado un deterioro ecológico, muchas veces irreversible, en los sitios de aplicación además de ser factores causantes de enfermedades en humanos, principalmente en las personas que los manejan. Como respuesta a los problemas generados por agroquímicos, en los últimos años se ha reportado el uso de productos naturales derivados del metabolismo vegetal, conocidos como metabolitos secundarios o fitoquímicos, para el control de plagas poniendo de manifiesto la creciente necesidad de encontrar alternativas de control fitosanitario que sean eficientes y menos agresivas con el medio ambiente y el ser humano.

Algunos metabolitos secundarios como los polifenoles son reconocidos por su capacidad para reducir o retardar el desarrollo de microorganismos causantes de enfermedades, de ahí la importancia de estudiar a los compuestos polifenólicos de plantas silvestres y su actividad antimicrobiana.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Extraer compuestos polifenólicos de especies silvestres de zarzamora para evaluar su actividad antimicrobiana.

4.2. Objetivos específicos

- Colectar y describir tres materiales silvestres morfológicamente contrastantes del género *Rubus*
- Estandarizar una técnica de extracción de compuestos polifenólicos a partir de distintos tejidos vegetales

- Evaluar la bioactividad de los extractos obtenidos frente a microorganismos fitopatógenos
- Fraccionar, identificar compuestos y evaluar actividad antimicrobiana del extracto crudo más activo

V. HIPÓTESIS

Las plantas silvestres de zarzamora poseen metabolitos secundarios como mecanismo de defensa. Los polifenoles, al ser metabolitos secundarios, presentarán un grado de inhibición contra fitopatógenos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1. Colecta de materiales silvestres

Para la determinación de los sitios de colecta de los materiales silvestres de zarzamora, se recurrió a la revisión de trabajos previos realizados dentro del grupo de trabajo del Laboratorio de Bromatología. Se colectaron las morfoespecies “Velloso” y “Glabra” en el cerro “La Charanda” en la ciudad de Uruapan, Michoacán, ubicado con los datos georreferenciales N 19° 26´17.6´´ W 102° 03´49.3´´ con una elevación de 1. Por otro lado, la morfoespecie “Cerosa” fue colectada en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Uruapan, ubicado en carretera Uruapan-Carapan No. 5555 Col. La Basilia dentro de la misma ciudad.

Las tres morfoespecies colectadas fueron seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas contrastantes, destacando la presencia o ausencia de pubescencias en el tallo, o en el caso de la morfoespecie “Cerosa” la existencia de una capa similar a una cera en todo su tallo, así como el color de dicho órgano.

6.1.2. Material microbiológico

La actividad antibacteriana de los extractos crudos de zarzamora se evaluó frente a la bacteria modelo *Pantoea stewartii*, la cual fue obtenida del cepario del Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV Unidad Irapuato a cargo del Dr. Víctor Olalde Portugal.

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Preparación del material vegetal para extracción de compuestos

Las hojas y tallos colectados de las tres morfoespecies fueron sometidos a un proceso de deshidratación por 24 horas haciendo uso de un deshidratador (Figura 28 A y B) doméstico de platos, rotándolos después de 12 horas de proceso.

Posteriormente, las hojas fueron pulverizadas en mortero de porcelana (Figura 28 C) y los tallos fueron cortados en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, para finalmente almacenarlos en bolsas de plástico herméticas.



Figura 27. Preparación de material vegetal para extracción de compuestos: A) Deshidratador, B) Hojas distribuidas de manera uniforme en los platos del deshidratador, C) Pulverización, D) Reducción de tamaño de los tallos

6.2.2. Obtención de extractos crudos (EC)

Extracciones por maceración con solventes orgánicos polares

Para el establecimiento de esta metodología se partió de 10 g de hojas y tallos deshidratados y macerados a los cuales se les sumergió en 100 mL de solvente (etanol al 96 % y metanol) por un periodo de 5 y 10 días a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, los extractos se filtraron en papel filtro Whatman #4 en un sistema de embudo acoplado a bomba de vacío, posteriormente se concentraron en evaporador rotatorio a 40 °C; finalmente se resuspendieron en una solución de DMSO (dimetil sulfóxido) y agua destilada 1:10 v/v. Para realizar la resuspensión se añadió por separado el DMSO y posteriormente el agua directo en el matraz donde se concentró el extracto. Los EC se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su utilización. Las extracciones se realizaron con 5 repeticiones para cada una de las tres morfoespecie y cada tejido vegetal (hoja y tallo) en la fase de establecimiento del método, después se hizo una sola extracción para cada tejido vegetal y especie.

Extracción sucesiva con equipo Soxhlet

Para la obtención de extractos se utilizó el equipo soxhlet (Figura 29) realizando una extracción sucesiva con los solventes n-hexano, cloroformo y metanol, en ese orden. De manera general el protocolo seguido consistió en utilizar 5 g de hoja deshidratada, colocada en un recipiente, hecho con papel filtro Whatman # 4 e introducirlo en un dedal de celulosa. La extracción se realizó con 150 mL de n-Hexano manteniéndolo en ebullición por cuatro horas, posterior a este tiempo se

realizó el cambio de solvente correspondiente (cloroformo y finalmente metanol). El dedal que contenía la muestra se extrajo del aparato en cada cambio de solvente y se introdujo en un horno de aire forzado a 80 °C para evaporar el solvente impregnado. Los EC obtenidos fueron concentrados y almacenados bajo las condiciones descritas en el apartado 2.2.1. Esta extracción se realizó por triplicado utilizando únicamente hoja de la especie *Rubus adenotrichos*.

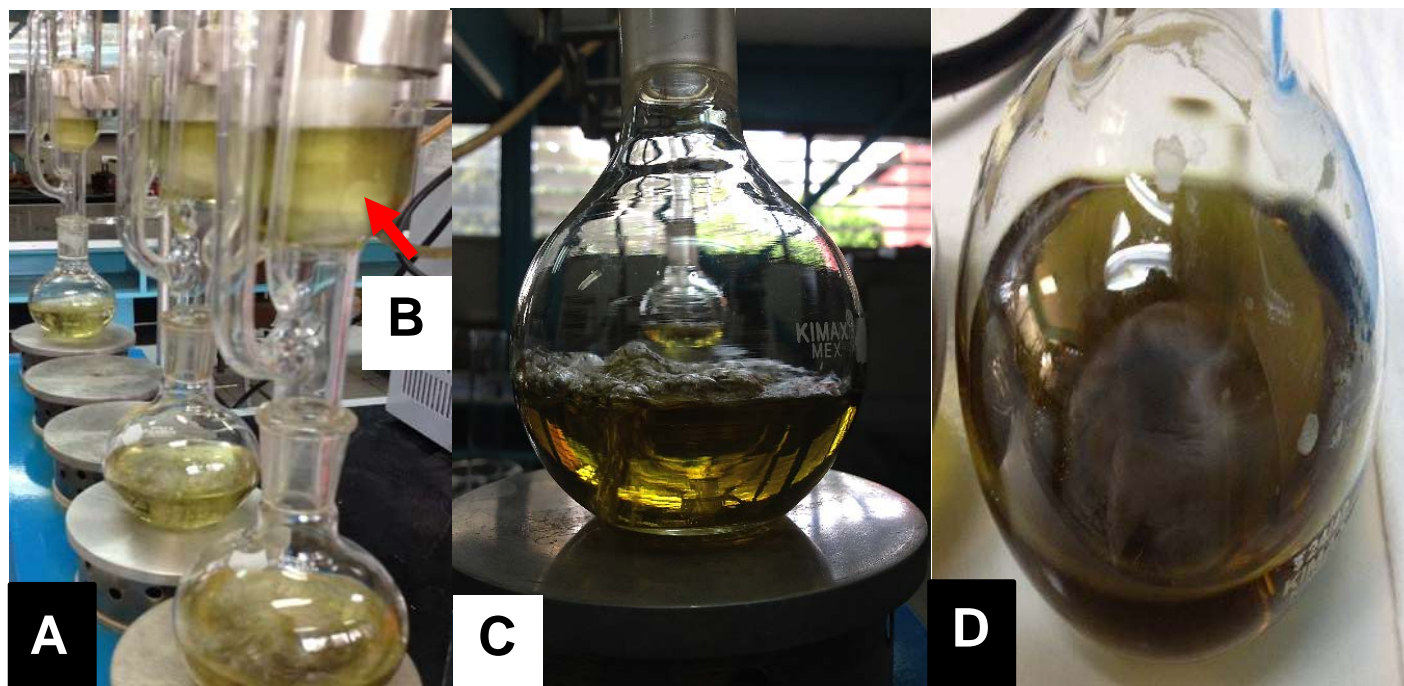


Figura 28. Extracción sucesiva de compuestos por cambio de polaridad de solvente: A) Equipo Soxhlet completamente montado, B) Dedal de celulosa con muestra en su interior, C) Ebullición continua de solvente, D) Extracto final

6.2.3. Cuantificación de compuestos polifenólicos

La cuantificación de compuestos polifenólicos se siguió con base al protocolo establecido por Estupiñán *et al.*, en 2011 y con algunas modificaciones de acuerdo a Singleton *et al.*, 1999. La mezcla de reacción consistió en 50 μL de muestra (extractos de tallos y hojas), 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) y 550 μL de agua destilada para un volumen final de 700 μL . Lo anterior consistió en la primera fase de la cuantificación donde se llevó a cabo una reacción de oxidación por acción del FC, dando un tiempo de incubación de 8 min; posteriormente se agregaron 300 μL de Na_2CO_3 y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se tomó lectura de la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro UV-Vis marca Nanodrop 2000c®, utilizando un blanco de reactivos con metanol.

Para reportar los resultados, se construyó una curva estándar de ácido gálico partiendo de una solución stock con una concentración de 0.5 mg/mL. Los resultados se expresaron como µg equivalentes de ácido gálico (EAG)/µL.

6.2.4. Bioensayos de actividad antimicrobiana

El protocolo seguido para estas evaluaciones fue establecido en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV-Unidad Irapuato y consta de las siguientes etapas:

*Cinética de crecimiento de *Pantoea stewartii* y determinación del tiempo de incubación para bioensayos*

Conocer el crecimiento de la bacteria fue fundamental tanto para determinar el tiempo de incubación del inóculo que se utilizaría en los bioensayos como para establecer el momento de evaluación de la inhibición de la bacteria. Para ello, se realizó una cinética de crecimiento de *Pantoea stewartii* en medio papa-dextrosa bajo las condiciones experimentales que se manejaron en todos los bioensayos: incubación a 37° C, agitación a 150 rpm, medición del pH y densidad óptica (DO) del medio a las 0, 0.5 y 1 horas, y posteriormente cada 2 horas hasta un tiempo total de 24 horas. La DO fue determinada en espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm. El ensayo se realizó por triplicado más 1 testigo que sirvió como blanco para calibrar el espectrofotómetro.

Tras la realización de la cinética, se graficaron los resultados y se hizo un ajuste de la curva para calcular el tiempo en el cual se alcanzó la fase estacionara de crecimiento bajo las condiciones experimentales establecidas; para ello, se utilizó el modelo lineal de Verhults-Pearl o modelo logístico (Jiménez-Delgadillo, 2004; tomado de Slater, 1985), cuya expresión matemática se muestra a continuación:

$$N = \frac{K}{1 + \exp^{a-\mu t}}$$

donde:

N: densidad poblacional (DO)

K: capacidad portadora del medio (DO)

µ: velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

t: tiempo (h)

a: constante

Con lo anterior, se obtuvo el valor de DO y el tiempo (N y t_{est}) en los cuales se llega al inicio de la fase estacionaria de crecimiento; por lo tanto, el tiempo de incubación de la bacteria para usarla como inóculo de los bioensayos y para evaluar la inhibición generada por exposición a los EC, se estableció 2 horas antes de t_{est} , corroborando que se alcanzara la DO correspondiente, pues en este punto la bacteria se encontraría en fase exponencial de crecimiento. Este análisis se realizó con el programa de análisis y visualización SciDAVis.

Por otro lado, se construyó una escala de turbidez del medio de cultivo inoculado con concentraciones crecientes de células bacterianas para correlacionar la DO del medio con las unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro. Con la ecuación de regresión lineal obtenida se interpolaron los valores de DO obtenidos en la cinética de crecimiento para conocer las UFC/mL correspondientes (datos no mostrados).

Con lo anterior se pudo conocer el tiempo de incubación del inóculo, el tiempo para evaluar la inhibición de la bacteria así como la DO y las UFC/mL que correspondían a cada evaluación.

Preparación del inóculo

En medio líquido papa-dextrosa se puso a crecer la bacteria a temperatura ambiente y en agitación a 150 rpm el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica de 0.9-1, la cual corresponde a una población bacteriana aproximada de 1×10^9 UFC/mL en la fase exponencial de crecimiento.

Preparación de los tratamientos

La descripción de los controles y tratamientos establecidos para esta evaluación se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Descripción de los tratamientos y controles establecidos en la evaluación de actividad antimicrobiana.

Tratamiento/Control	Descripción
Control absoluto	Medio papa-dextrosa (PD)
Disolución usada para resuspensión de extractos (control)	DMSO-H ₂ O 1:10 en medio PD
Extractos crudos	Dilución 1:10 de los EC en medio PD

Se agregaron 500 μ L del inóculo a cada tratamiento/control y fueron incubados durante 10 horas a temperatura ambiente en agitación a 150 rpm. Cada control y tratamiento se estableció por triplicado.

Siembra en placa para conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL

Transcurrido el tiempo de incubación se emplearon los métodos de diluciones seriales y siembra en placa para contabilizar las UFC/mL (Figura 30).

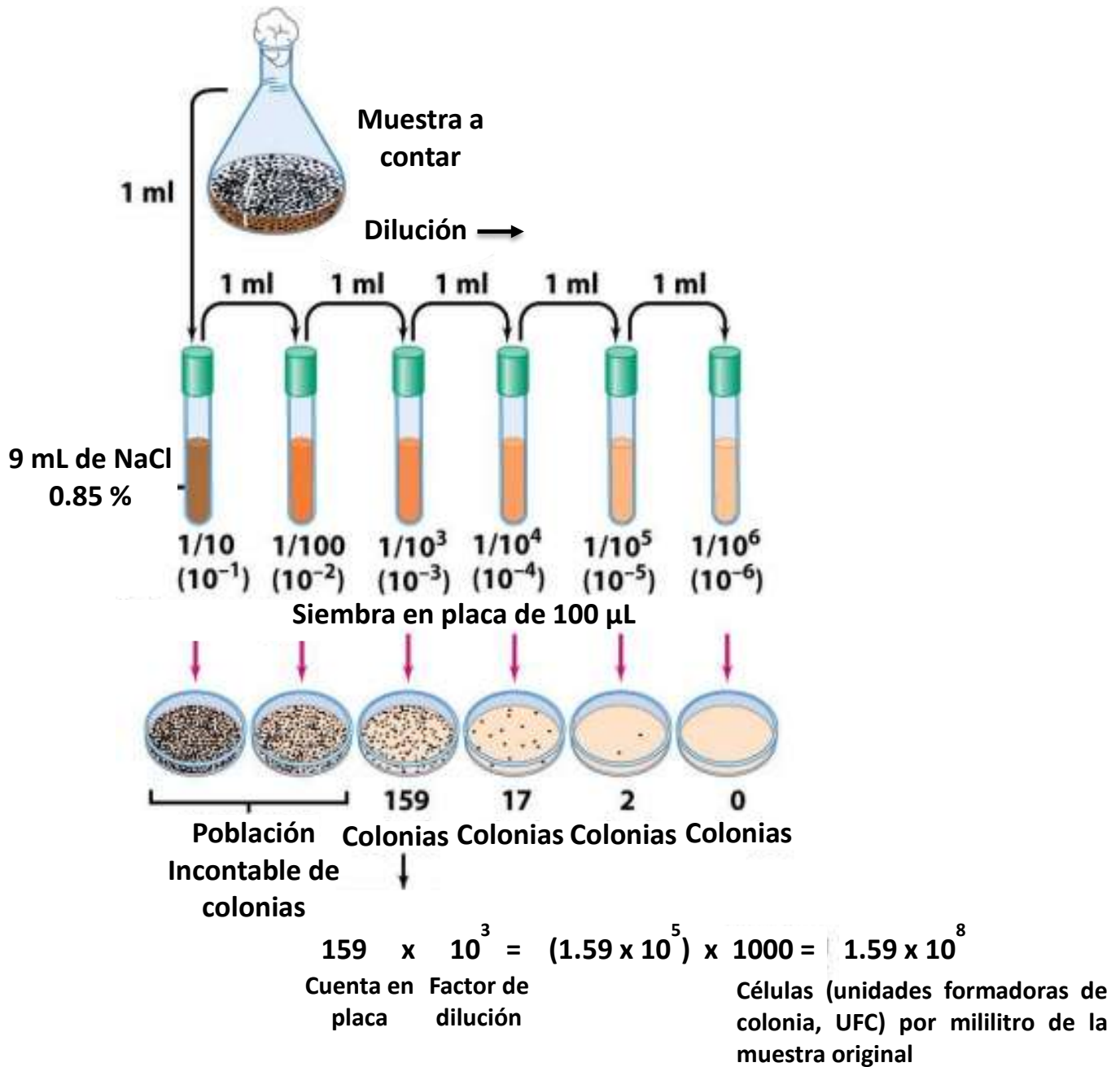


Figura 29. Métodos de diluciones seriales y siembra en placa (tomado de Brock *Biología de los Microorganismos*)

En términos generales, se realizaron diluciones decimales de cada tratamiento/control para disminuir la densidad poblacional bacteriana y se sembraron en placa las últimas 2 diluciones para cada caso. Para ello, cajas de Petri con medio agar papa-dextrosa (PDA) fueron sembradas con 100 μ L de muestra de acuerdo a la metodología descrita en la Figura 31.

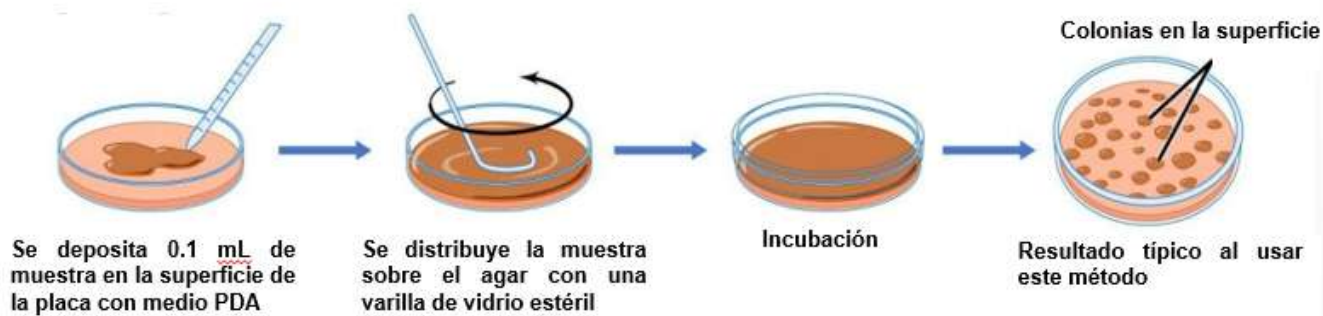


Figura 30. Método de siembra en placa

Finalmente, las placas fueron incubadas bajo las condiciones descritas en los apartados anteriores.

Cálculo del porcentaje de inhibición

Considerando el número de UFC/mL de tratamientos y control, los porcentajes de inhibición fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{UFC/mL}_{\text{control}} - \text{UFC/mL}_{\text{extracto}}}{\text{UFC/mL}_{\text{control}}} \times 100$$

6.2.5. Fraccionamiento del extracto tallo *Rubus adenotrichos* en cromatografía en columna empacada (CCE)

Tomando como referencia los resultados obtenidos en los bioensayos de actividad antimicrobiana frente a la bacteria modelo, se seleccionó el extracto más activo, tallo de *Rubus adenotrichos*, para proceder a su fraccionamiento por CCE, siguiendo el protocolo propuesto por Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010, que consistió en dos fases:

Fase 1: se empacó una columna cromatográfica de 30x5 cm con resina Amberlita XAD-7 Sigma-Aldrich® adecuada para la separación de compuestos polares y medianamente polares, la cual fue equilibrada con 500 mL de H₂O acidificada (ácido fórmico al 0.3 % v/v). Después, se agregaron 10 mL del extracto y se

eluyeron con 500 mL del mismo solvente anteriormente mencionado, obteniendo una única fracción cromatográfica denominada fracción no polifenólica (FNP). En esta primera fase el objetivo fue eliminar impurezas del extracto, como azúcares y proteínas, y concentrar los polifenoles que quedan adsorbidos a la resina. Finalmente, la FNP fue concentrada en evaporador rotatorio a 70 °C y almacenada a 4 °C hasta su utilización en bioensayos.

Fase 2: los polifenoles adsorbidos a la resina fueron eluidos con 750 mL de metanol al 80 % acidificado (ácido fórmico al 0.3 % v/v), obteniendo 15 fracciones cromatográficas de 50 mL denominadas como fracciones polifenólicas post-amberlita (FPPA). Debido a que se obtuvo un número elevado de fracciones y éstas deberán someterse a bioensayos de actividad antimicrobiana, se decidió considerar sólo las 10 primeras fracciones, inicialmente, y formar 5 subfracciones (SFP) haciendo mezclas de dos fracciones; es decir, se hizo una mezcla en proporción 1:1 de las fracciones 1 y 2, de la 3 y 4, y así sucesivamente. Las SFP concentraron en evaporador rotatorio a 40 °C y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización en bioensayos de actividad antimicrobiana.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación y descripción de especies silvestres de zarzamora

Se logró la identificación de dos de las tres morfoespecies de zarzamora evaluadas, con el apoyo del Dr. Rzedowski y el Dr. Zamudio del Instituto de Ecología A. C., de la ciudad de Pátzcuaro, Michoacán. Los materiales colectados para este trabajo fueron cotejados con ejemplares depositados en la colección del instituto antes mencionado para lograr su identificación mediante la comparación de características morfológicas de hojas, tallos, frutos, inflorescencias, porte, pubescencias, tipo de espinas, etc.

La morfoespecie “Velloso” fue identificada como *Rubus adenotrichos* (Figura 32); es un arbusto arqueado, trepador o reclinado sobre otras plantas, siempre verde; láminas foliares en su mayoría digitadamente 5-foliadas, las superiores trifoliadas o a veces simples, folíolos ovados a elípticos de 3 a 8 cm de largo y 2 a 5 cm de ancho; inflorescencia pubescente a semejanza de los tallos, pero por lo general sin aguijones, pétalos blancos o rosados; fruto ovoide de 1 a 2 cm de largo, desprendiéndose junto con el receptáculo, drupillas numerosas, casi negras en la madurez; tallos rojizos, hasta de 3 cm de grosor, densamente cubiertos, al menos en la juventud, con pelos o cerdas glandulares rojizas hasta de 3 mm de largo (Figura 33; Rzedowski y Calderón, 2005).

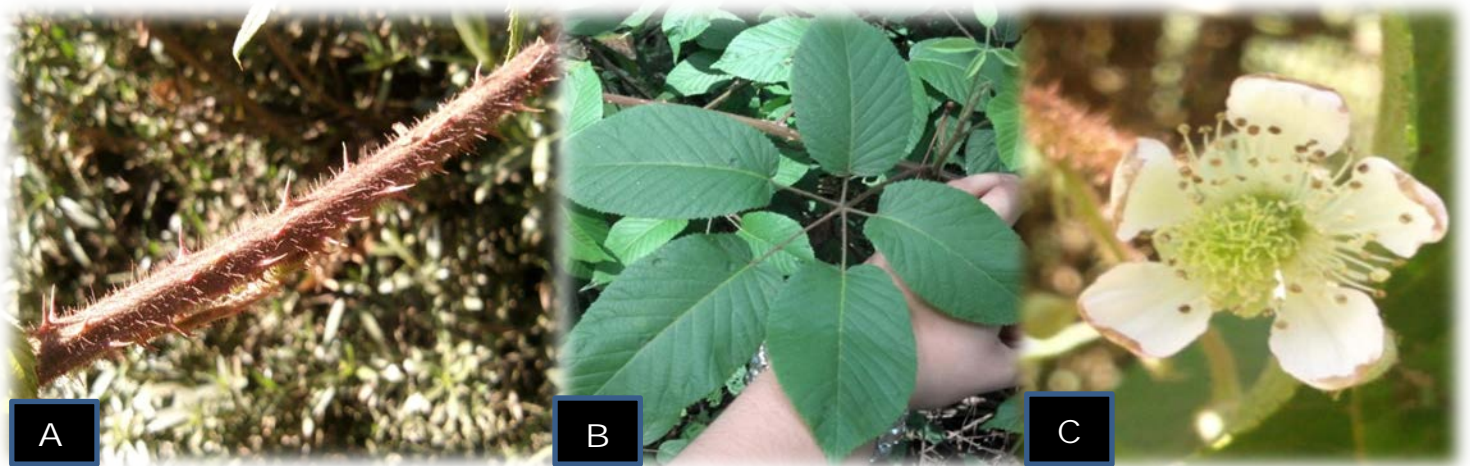


Figura 31. *Rubus adenotrichos* A) Tallo, B) Hoja y C) Flor

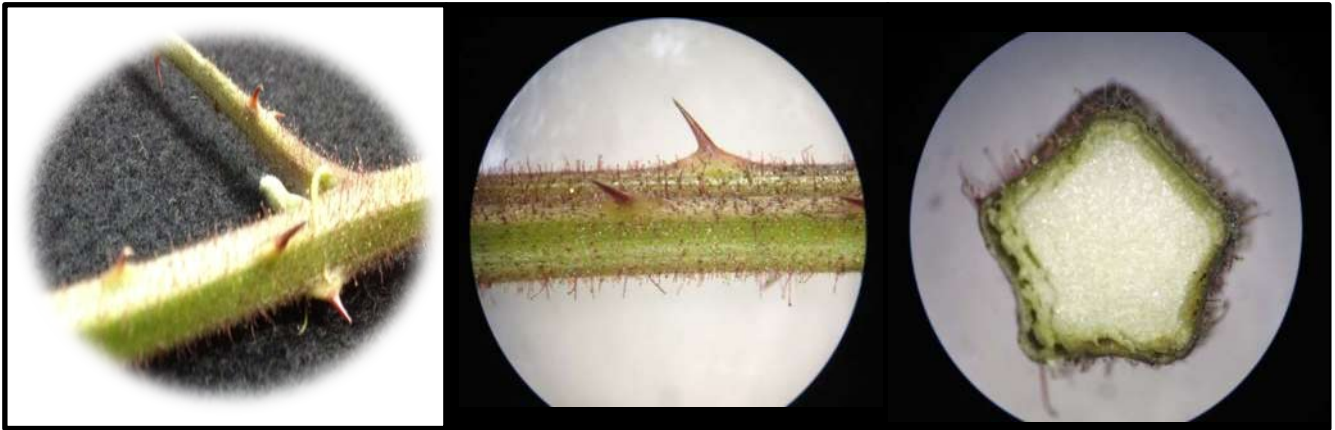


Figura 32. Tallos de *Rubus adenotrichos* vistos directamente y bajo estereoscopio

La morfoespecies “Glabra” fue identificada como *Rubus coriifolius*; la planta posee hojas compuestas por cinco folíolos ovalados o lanceolados, con dientes irregulares, estipulados, pecíolos pubescentes, espinosos y nervios bien marcados, de un brillante verde oscuro por el haz y envés con pilosidad blanquecina (Figura 34). Son arbustos que presentan tallos leñosos con gran flexibilidad, semitrepadores, angulosos y provistos de espinas cortas curvadas, pubescencia variada, cortos (Figura 35). Se caracteriza por presentar una inflorescencia piramidal truncada con un gran número de flores de color blanco.



Figura 33. *Rubus coriifolius*, A) Tallo, B) Hoja y C) Flor

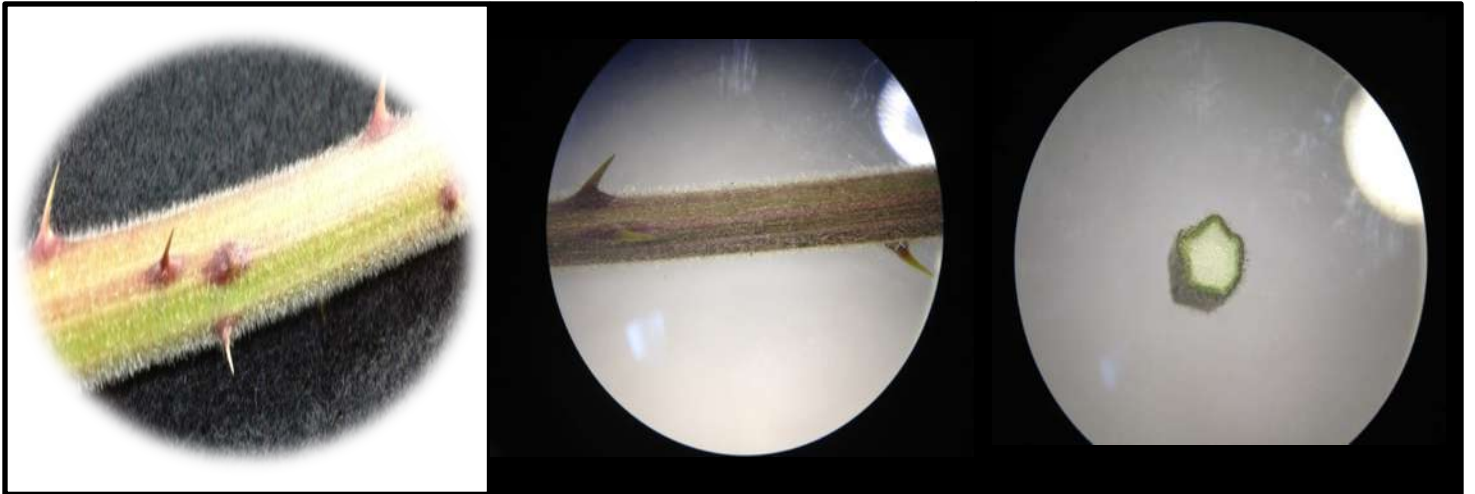


Figura 34. Tallos de *Rubus coriifolius* vistos directamente y bajo estereoscopio

La morfoespecie “Cerosa” no pudo cotejarse con alguna especie en particular que permitiera su identificación; sólo se sabe que es un ejemplar perteneciente al género *Rubus*. Debido a esto, mayores investigaciones, colectas y cotejos deberán realizarse para lograr identificarla.

Esta planta presenta un porte arqueado y arbustivo; presenta hojas compuestas por cinco folíolos ovalados o lanceolados, con nervios bien marcados de un brillante verde oscuro por el haz y envés sin pilosidad (Figura 36); tallos glabros y con coloración blanquecina o rojiza que brinda la apariencia de una cera (Figura 37).



Figura 35. Morfoespecie “Cerosa”, A) Tallo y B) Hoja

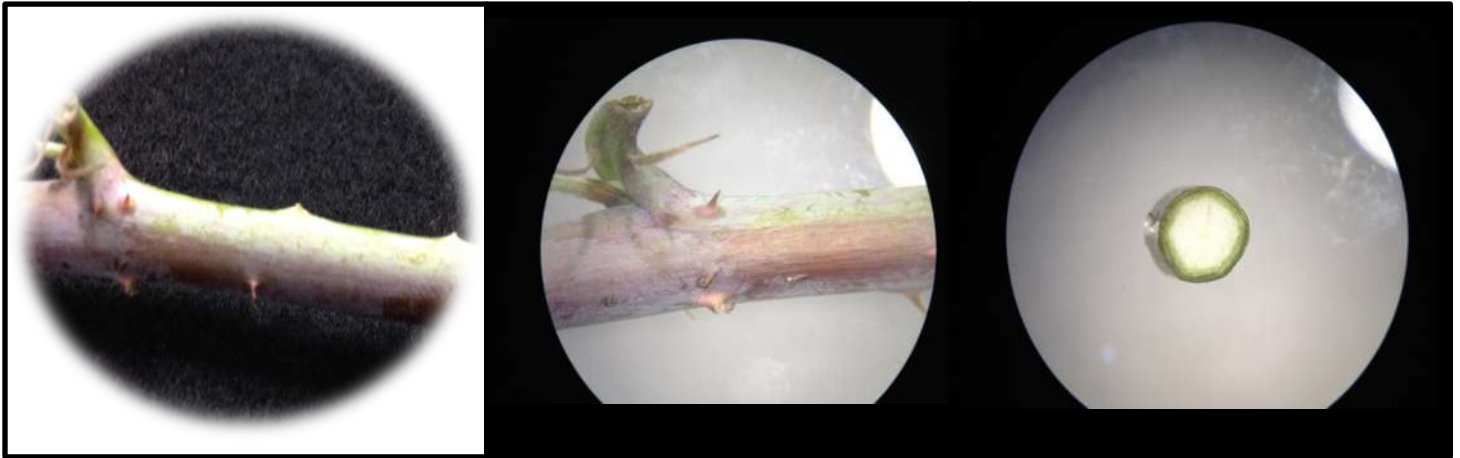


Figura 36. Tallos de la morfoespecie "Cerosa" vistos directamente y bajo estereoscopio

7.2. Estandarización de una técnica de extracción de polifenoles

Se determinó el contenido de polifenoles totales en extractos etanólicos obtenidos después de 5 días de extracción para los tres materiales silvestres de zazamora considerados en este trabajo, observando diferencias significativas entre repeticiones en cada ensayo (datos no mostrados). En este análisis no se realizó una homogenización de toda la colecta; al no hacerlo el contenido de polifenoles totales varió entre extractos de un mismo tejido y especie, como se ejemplifica en la Figura X para la especie *Rubus coriifolius*.

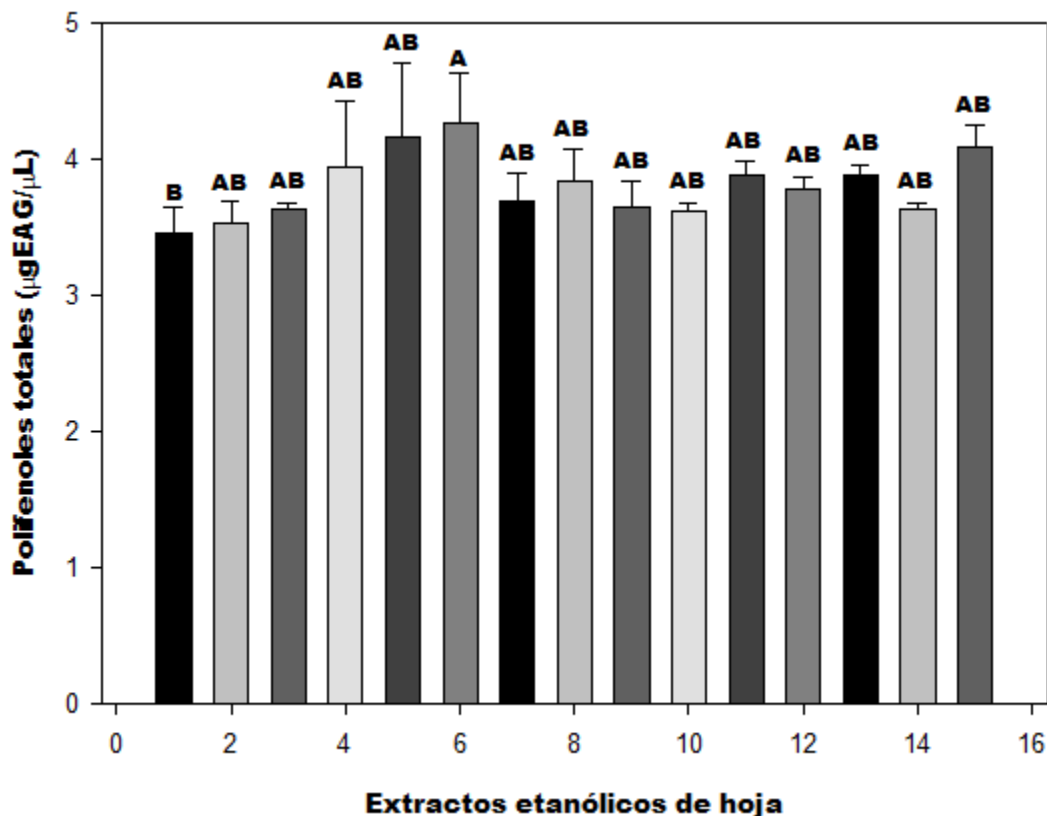


Figura 37 Contenido de polifenoles totales^a en 15 extractos etanólicos obtenidos por maceración de hojas deshidratadas de *R. coriifolius*. Literales distintas denotan diferencias significativas, Tukey ($p < 0.05$). ^aMedia de un total de tres réplicas para cada extracto.

De los 15 extractos obtenidos para hoja de *R. coriifolius*, se obtuvieron diferencias significativas en dos de ellos bajo el esquema de un diseño experimental completamente al azar; este resultado puede atribuirse a diferencias en el contenido de compuestos polifenólicos en las hojas y tallos dependiendo de su etapa de desarrollo y de la zona que ocupaban en la planta de la cual fueron obtenidos.

Para la realización de extracciones posteriores, las hojas y tallos fueron seleccionados y cortados de forma aleatoria en diferentes zonas de la planta; para eliminar el sesgo de la fase inicial de estandarización y descartar que el efecto anteriormente descrito fuera atribuible al manejo de la técnica, se realizó una homogenización de la totalidad del material vegetal colectado y se diseñó un nuevo experimento como se describe en la sección 5.2.2.1 de materiales y métodos. Al finalizar la extracción, se registró el contenido de polifenoles totales (datos no mostrados), definiendo este experimento como la metodología de extracción por maceración, sujeta a ajustes que se describirán detalladamente.

La extracción de polifenoles por maceración ha sido ampliamente aplicada para una gran variedad de plantas y frutos, así como con distinto solventes y a distintas

concentraciones, tal es el caso de ejemplares silvestres y cultivados pertenecientes al género *Rubus*; por ejemplo, frutos de *Rubus glaucus* y *Rubus adenotrichus*, utilizando cetona al 70 % acidificada con ácido fórmico al 2 % y acetato de etilo (Mertz *et al.*, 2007); *Rubus glaucus* Benth, realizando la extracción acetona al 70 y 100 %, y una posterior partición de los extractos con acetona/cloroformo 1:2 v/v (Garzón *et al.*, 2009); *Rubus idaeus* L., *Rubus fruticosus*, *Fragaria x ananassa* y *Fragaria vesca*, usando acetona/agua 70:30 v/v y metanol/agua 60:40 v/v para la obtención de distintos tipos de compuestos polifenólicos (Vrhousek *et al.*, 2006); híbridos de zarzamora *Rubus* L., empleando acetona al 70 y 100 % y cloroformo para la obtención de polifenoles (Siriwoharn *et al.*, 2004); hojas de *Rubus ideaus* sometidas a extracción con etanol al 96 % (Venskutonis *et al.*, 2007); semillas de *Rubus ulmifolius* en extracción metanólica (Fazio *et al.*, 2013), etc. Sin embargo, también se han reportado otras técnicas como la extracción sucesiva (Proestos y Komaitis, 2008) en aparato Soxhlet (Panizzi *et al.*, 2002), empleando distintos solventes de distintas polaridades, poniendo en contacto la muestra, primeramente, con solventes no polares e ir cambiando a solventes cada vez más polares dependiendo de los objetivos de las evaluaciones que se harán con los extractos resultantes.

Para lograr la estandarización de la técnica de extracción, los resultados obtenidos se dividen en tres factores evaluados:

- 1) Tiempo de extracción

Respecto a la respuesta factorial de la interacción tiempo y especies observado en la Figura X, se sugiere que el diseño propuesto para la extracción de compuestos brinda la posibilidad de detectar diferencias de concentración de polifenoles en un mismo órgano entre diferentes especies, además de observar las diferencias producidas por el tiempo (datos no incluidos en la figura).

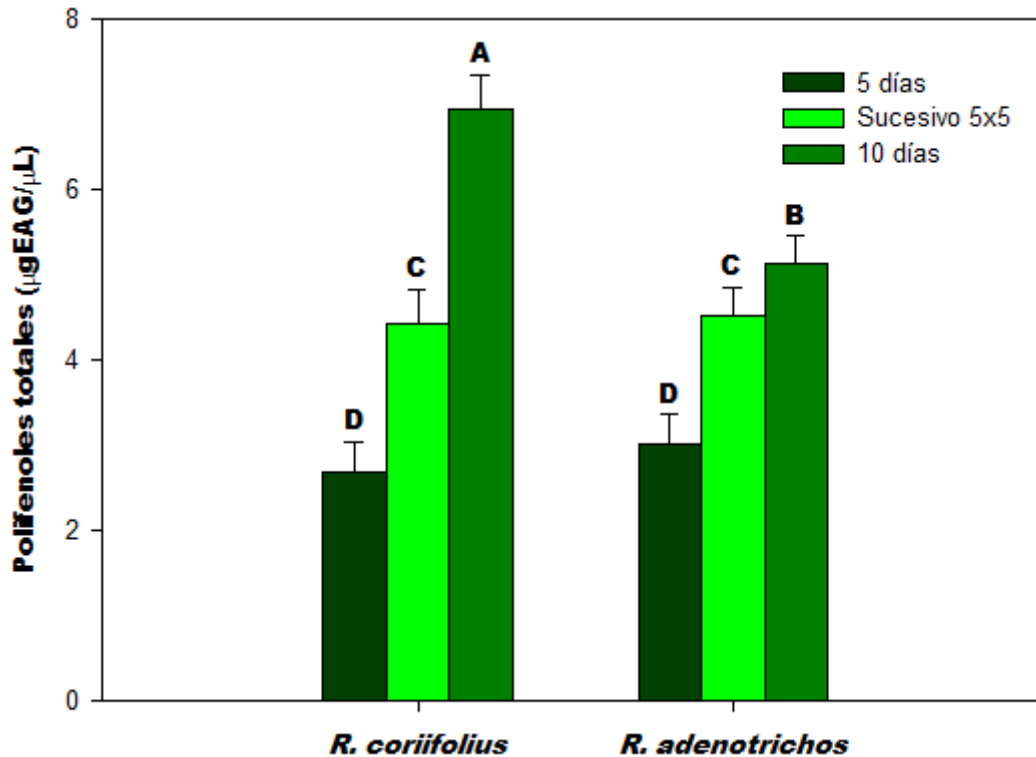


Figura 38. Efecto del tiempo sobre el contenido de polifenoles totales en extractos etanólicos de hoja de *R. coriifolius* y *R. adenotrichos*. Literales distintas denotan diferencias significativas entre tratamientos comparando ambas especies, Tukey ($p < 0.05$)

La determinación del contenido de polifenoles totales para los extractos etanólicos de hoja de *R. coriifolius* y *R. adenotrichos*, se obtuvo la mayor concentración de compuestos en 10 días de maceración, 6.946 ± 0.395 y 5.126 ± 0.339 $\mu\text{g EAG}/\mu\text{L}$ respectivamente presentando diferencias significativas entre especies. La cantidad de polifenoles registrada para los extractos obtenidos en 5 y 5x5 días sucesivos de extracción fueron inferiores a la correspondiente a 10 días, para ambas especies; además estos dos tratamientos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre especies lo cual significa que existe un contenido de polifenoles igual en los extractos obtenidos, no así para los tratamientos de 10 días donde *R. coriifolius* presentó mayor contenido de polifenoles respecto a *R. adenotrichos*. Esto significa que, además de la determinación del mejor tiempo de extracción, se observaron los primeros indicios sobre diferencias en el contenido de polifenoles entre las especies evaluadas. Por otro lado, es importante mencionar que la extracción sucesiva en 5x5 días fue descartada para análisis posteriores debido a que fue el tratamiento donde se registró una menor cantidad de compuestos polifenólicos extraídos comparada con la maceración por 10 días directos y, metodológicamente, es la que representa mayor gasto de materiales y reactivos.

Por otro lado, diferentes solventes han sido usados para la extracción de polifenoles a partir de material vegetal. La concentración y la actividad antioxidante, de extractos naturales dependen del solvente utilizado; por ejemplo, el agua es un mejor solvente para la extracción de catequinas comparada con metanol al 80 % y etanol al 70 %. Así también distintos procedimientos han sido propuestos, tal es el caso de las extracciones mediante grasas y aceites, solventes orgánicos, soluciones alcalinas acuosas y con CO₂ supercrítico; las mezclas acuosas de etanol, metanol y acetona son las más utilizadas (Hayouni *et al.*, 2007). En este contexto el método de extracción de fenólicos a partir de un material vegetal usado como sustrato y el método ideal de extracción para clases particulares de compuestos de este tipo, deberán ser individualmente diseñado y optimizado (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2013).

2) Interacción del solvente y tiempo para la extracción por maceración

En esta fase, se evaluó la variable de respuesta contenido de polifenoles totales en extractos obtenidos por maceración en un diseño factorial donde el tiempo y el solvente fueron los factores considerados y cuyo análisis estadístico se hizo de forma independiente. En la Figura X se muestran los resultados de los tratamientos establecidos con etanol y metanol como solventes durante 5 y 10 días de maceración para las especies *R. coriifolius* y *R. adenotrichos*; este análisis sólo fue realizado con el tejido hoja.

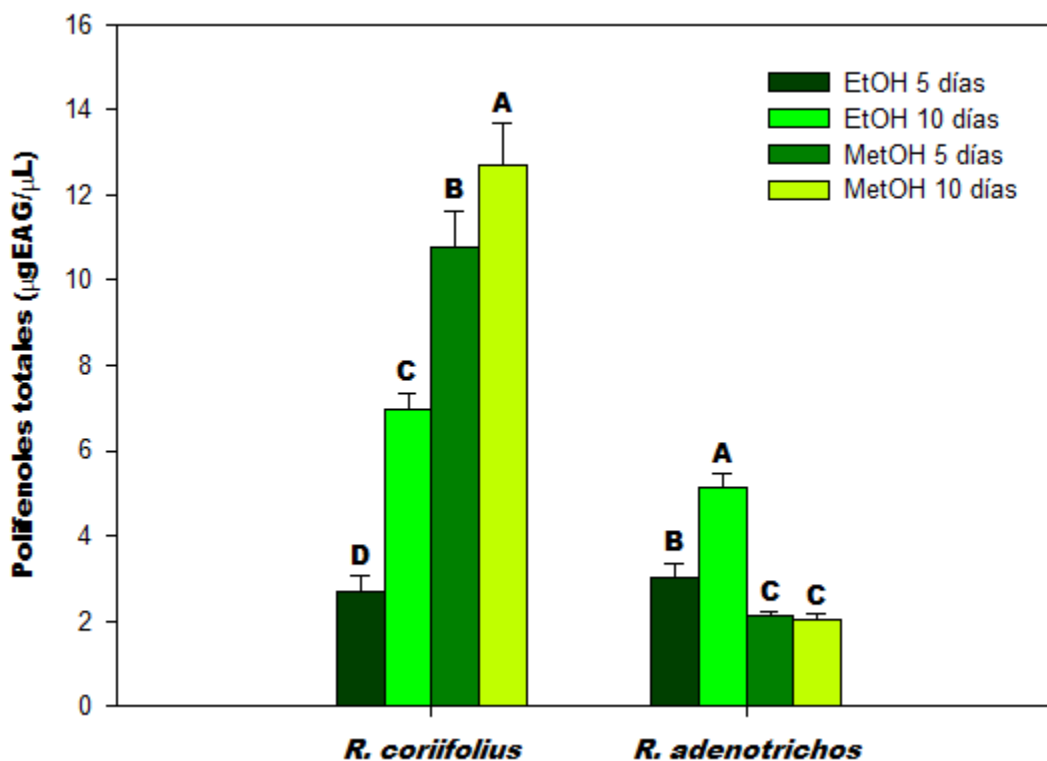


Figura 39. Efecto del tiempo y solvente sobre el contenido de polifenoles totales en extractos de hoja *R. coriifolius* y *R. adenotrichos* analizados independientemente en un diseño factorial 2². Literales distintas denotan diferencias significativas, Tukey ($p < 0.05$)

Para *R. coriifolius*, el mejor tratamiento correspondió a la extracción con metanol durante 10 días; contrastantemente el extracto etanólico de *R. adenotrichos* obtenido después de 5 días registró la mayor cantidad de polifenoles totales. Considerando de forma aislada el efecto de los tratamientos en ambas especies de zarzamora, todos los extractos de *R. coriifolius* presentaron diferencias estadísticas significativas con una máximo contenido de polifenoles de 12.32 ± 0.547 µg EAG/µL en el mejor tratamiento y un mínimo de 2.679 ± 0.363 para la extracción con etanol por 5 días. En el caso de *R. adenotrichos* se obtuvo una concentración máxima de 5.126 ± 0.339 µg EAG/µL en maceración con etanol por 10 días, mientras que los extractos metanólicos registraron un menor contenido siendo iguales entre ellos ($p < 0.05$). Adicionalmente, este análisis permitió determinar las diferencias en el contenido de compuestos polifenólicos de acuerdo al solvente usado ya que para ambas especies cuando el factor tiempo se mantiene fijo, el cambio de solvente de etanol a metanol provoca una variación en la concentración de compuestos obtenida. Este efecto se observa en ambas especies; así, lo anteriormente mencionado permite precisar al metanol como el mejor solvente para la extracción de los polifenoles presentes en *R. coriifolius* por un periodo de 10 días, mientras que para *R. adenotrichos* el etanol resultó ser el extractante más eficiente a 5 días de maceración. Estas diferencias podrían atribuirse al diferente perfil fenólico y polifenólico de cada especie, siendo la

afinidad solvente-compuesto un aspecto determinante en la cantidad de compuestos alcanzada.

Boulekbache-Makhlouf y colaboradores (2013) determinaron el contenido de polifenoles totales de extractos de cáscaras deshidratadas en polvo de *Solanum melongena* evaluando el efecto del solvente utilizado y registrando valores de 26.61 ± 0.67 , 13.53 ± 0.21 y 29.39 ± 1.23 mg EAG/100 g de extracto seco, para metanol al 70 %, etanol al 70 % y acetona al 70 %, respectivamente. Con esta misma planta se registró un contenido de 49.02 ± 1.3 mg EAG/ 100 g de extracto seco utilizando metanol como solvente (Nisha *et al.*, 2009) y 55.19 ± 1.3 mg EAG/100 g de extracto seco utilizando etanol (Eun-Ju *et al.*, 2011). Los autores establecen que estas diferencias en el contenido de polifenoles pueden deberse a las condiciones de la cáscara utilizada en la preparación de los extractos, en fresco o deshidratada. Sin embargo, las variaciones en las cuantificaciones podrían atribuirse también a las distintas concentraciones de los solventes bajo las cuales se evaluó el contenido de polifenoles.

Con la finalidad de complementar la evaluación representada en la figura anterior, también se hizo un análisis factorial 3^2 , donde los factores considerados fueron especie silvestre de zarzamora, con sus niveles *R. coriifolius* y *R. adenotrichos*; tiempo de extracción cuyos niveles fueron 5 y 10 días, y solvente con etanol al 96 % y metanol como niveles. Los resultados de este análisis se reportan en la Figura X con una comparación de medias aplicando la prueba de Tukey a $p < 0.05$.

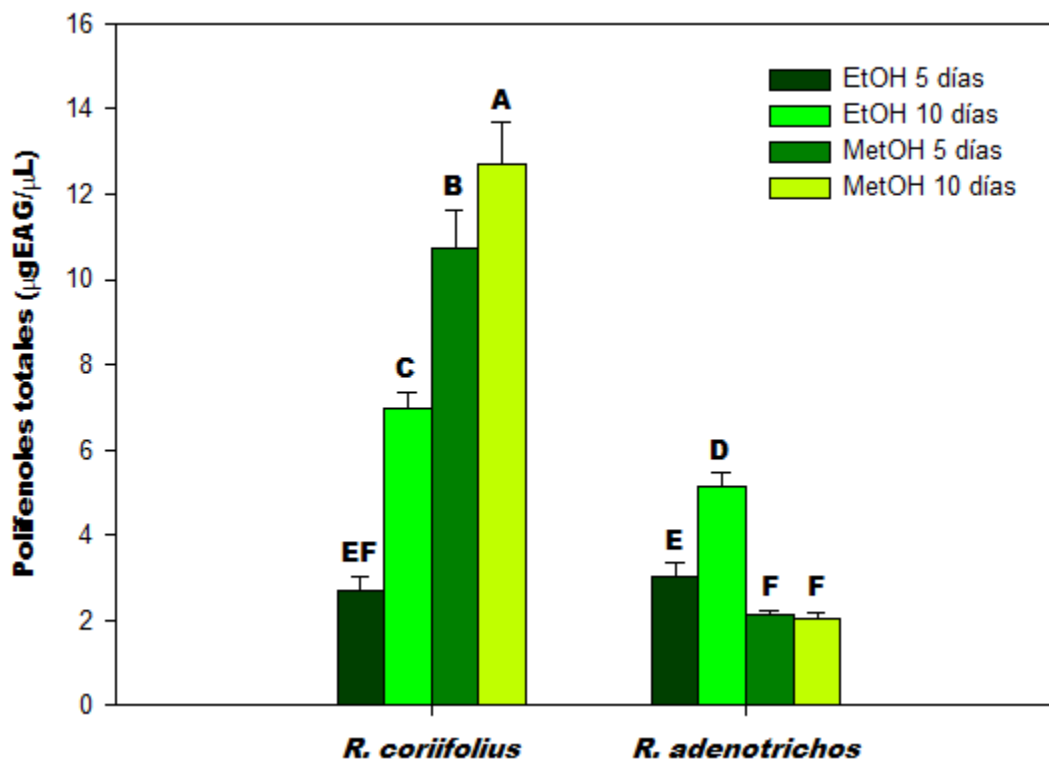


Figura 40. Efecto del tiempo, solvente y especie sobre el contenido de polifenoles totales en extractos de hoja de *R. coriifolius* y *R. adenotrichos* obtenidos por el método de maceración analizados en un diseño factorial 3². Literales distintas denotan diferencias significativas, Tukey ($p < 0.05$)

De este análisis resulta interesante destacar que fue posible identificar no sólo los tratamientos que registraron un mayor contenido de compuestos polifenólicos sino también aquellos que permitieron fijar condiciones de extracción sin diferencias estadísticas significativas entre las especies, tal es el caso de ambos extractos metanólicos de *R. adenotrichos* y el etanólico de 5 días cuyo contenido en polifenoles es igual al extracto etanólico de 5 días de *R. coriifolius*. Esto nos indica que un método de extracción debe optimizarse y adecuarse al modelo de estudio, y para este caso, se demuestra que deberán ajustarse las condiciones de extracción para las especies de zarzamora ya que un mismo protocolo de extracción no presenta la misma eficiencia de extracción de compuestos polifenólicos entre especies, aunque esto está sujeto a los fines perseguidos para la aplicación de los extractos finales, como se describirá más adelante. Hasta este punto, la maceración metanólica por 10 días fue definida como el protocolo común a utilizar para los materiales y tejidos vegetales a evaluar en este trabajo por razones que serán aclaradas en el siguiente punto.

3) Diferentes técnicas de extracción

Con la finalidad de comparar la maceración, la cual constituye el método mayoritariamente reportado para la extracción de compuestos polifenólicos se estableció una extracción sucesiva en aparato Soxhlet como se describe en la sección 5.2.2.2 de materiales y métodos. Brevemente, se usaron hojas deshidratadas de *Rubus adenotrichos* que fueron sometidas a reflujo constante de n-hexano, cloroformo y metanol, analizando únicamente el contenido de polifenoles en el último. La extracción fue realizada por triplicado y su contenido en polifenoles totales se muestra en la Figura X.

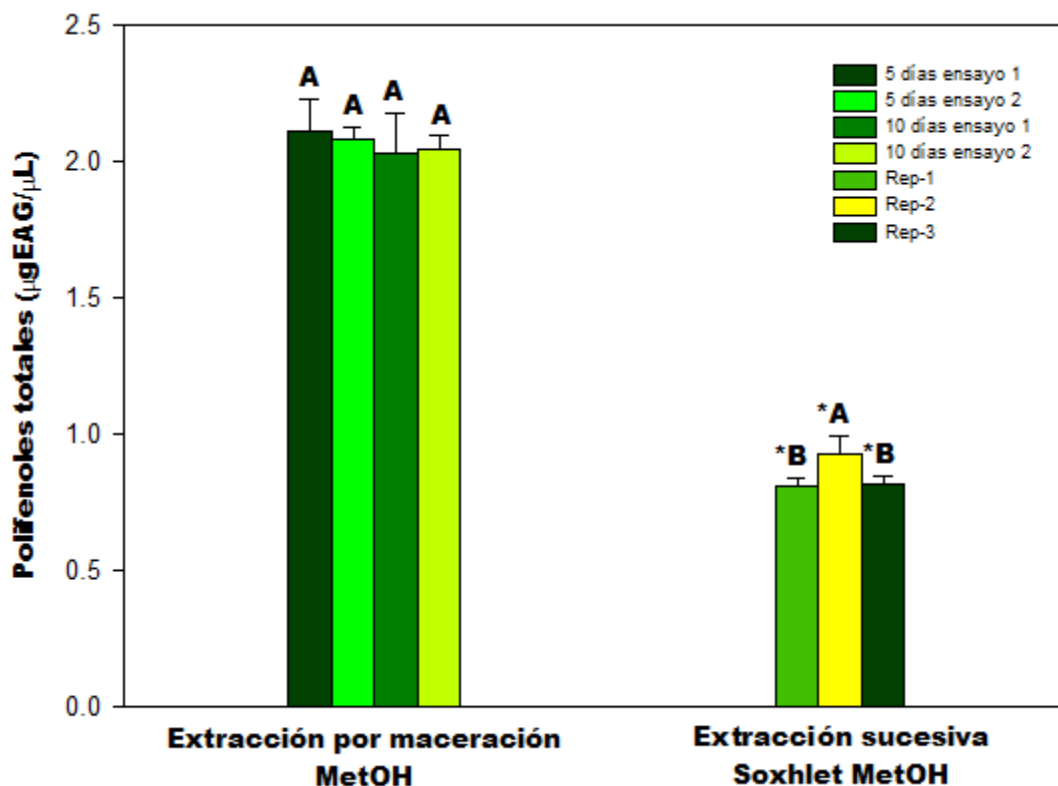


Figura 41 Comparación de métodos para extracción de polifenoles totales, extracción por maceración y sucesiva en equipo Soxhlet, utilizando metanol como extractante para hoja de *R. adenotrichos* y su reproducibilidad en análisis independientes. Literales distintas denotan diferencias significativas, Tukey ($p < 0.05$) y *Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

Se compararon los niveles de compuestos polifenólicos en extractos obtenidos por dos métodos distintos, maceración y extracción sucesiva, usando metanol como extractante. Respecto al método de maceración con metanol, en dos extracciones realizadas aisladamente con el mismo material vegetal se observó el mismo efecto plasmado en la figura anterior; el tiempo de maceración no tuvo efecto sobre el contenido de polifenoles alcanzado en los extractos siendo iguales estadísticamente ($p < 0.05$), con un valor aproximado de $2.2 \mu\text{g EAG}/\mu\text{L}$. Además, al no presentarse diferencias significativas entre los extractos obtenidos en ensayos aislados, puede sugerirse que el método presentó buena reproducibilidad en las condiciones ensayas. Paralelamente, se realizó una comparación de medias con la prueba Tukey-Kramer, a un nivel de significancia $p < 0.05$, observando que dos de las tres repeticiones hechas para la extracción sucesiva en equipo Soxhlet poniendo de manifiesto que esta técnica no presentó buena reproducibilidad aunada a un menor contenido de compuestos polifenólicos (0.679 ± 0.01 , 0.819 ± 0.02 y $0.664 \pm 0.01 \mu\text{g EAG}/\mu\text{L}$) respecto a la extracción por maceración. A pesar de que la extracción sucesiva también ha sido reportada para la obtención de polifenoles (Proestos y Komaitis, 2008; Panizzi *et al.*, 2002), de acuerdo a los resultados presentados en este trabajo se consideró a la extracción

por maceración como la mejor técnica, ya que permite la obtención de mayores cantidades de polifenoles totales de un mismo material vegetal con buena reproducibilidad. La menor concentración de compuestos en los extractos metanólicos obtenidos en equipo Soxhlet puede atribuirse a los pasos o extracciones previas que sufrieron las muestras, ya que primeramente se usó n-hexano seguido de cloroformo, pudiendo haber tipos de polifenoles medianamente polares presentes en dichos extractos los cuales no fueron considerados en las evaluaciones presentadas. Reportes previos mencionan la presencia de polifenoles, principalmente oligómeros y polímeros de flavonoides, en extractos o fracciones con solventes menos polares como cloroformo, acetona al 70 y 100 % y acetato de etilo (Siriwoharn *et al.*, 2004; Mertz *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009).

Proestos y Komaitis (2008) realizaron la extracción de polifenoles por el método tradicional de reflujo con solventes y proponen la extracción rápida asistida por microondas, además de comparar cuatro mezclas de solventes distintas: a) metanol-agua 60: 40 v/v, b) acetona-agua 60:40 v/v; c) agua y d) acetato de etilo-agua 60:30 v/v), utilizando 6 diferentes plantas aromáticas de Grecia. En todos los casos, el agua resultó ser el extractante que permitió obtener una cantidad más elevada de polifenoles totales en todas la plantas evaluadas; por ejemplo, para *Styrax officinalis* se registró la mayor concentración en el extracto acuoso, 20.1 ± 0.4 mg AG/g p.s., mientras que con el sistema de extracción d) sólo se obtuvieron 4.8 ± 0.1 mg AG/g p.s., mediante el método de reflujo y sin diferencias significativas respecto a la extracción asistida por microondas. Finalmente, es importante mencionar que en todos los reportes citados en esta sección se efectuó la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, exceptuando el trabajo de Díaz-García *et al.*, en 2013.

En este trabajo evaluamos la extracción de polifenoles utilizando dos solventes orgánicos, metanol y etanol al 96 %, obteniendo una mayor concentración de compuestos en los extractos metanólicos; sin embargo, la cantidad de polifenoles puede no ser el aspecto más importante de una extracción, esto dependerá de los efectos o potenciales que se deseen evaluar. Para los fines que se persiguen en este estudio, se ha establecido que la actividad antimicrobiana, entre otros potenciales, no dependen directamente de la cantidad de polifenoles totales; se profundizará en el tema en la sección 7.3.

7.3. Bioensayos de actividad antimicrobiana

7.3.1. Estandarización del inóculo

Se hizo una cinética de crecimiento de *Pantoea stewartii* en medio líquido papa-dextrosa durante 24 horas; se graficó la absorbancia medida cada dos horas contra tiempo y se determinaron los parámetros del modelo lineal de Verhults-Pearl, obteniendo el gráfico de la Figura 40.

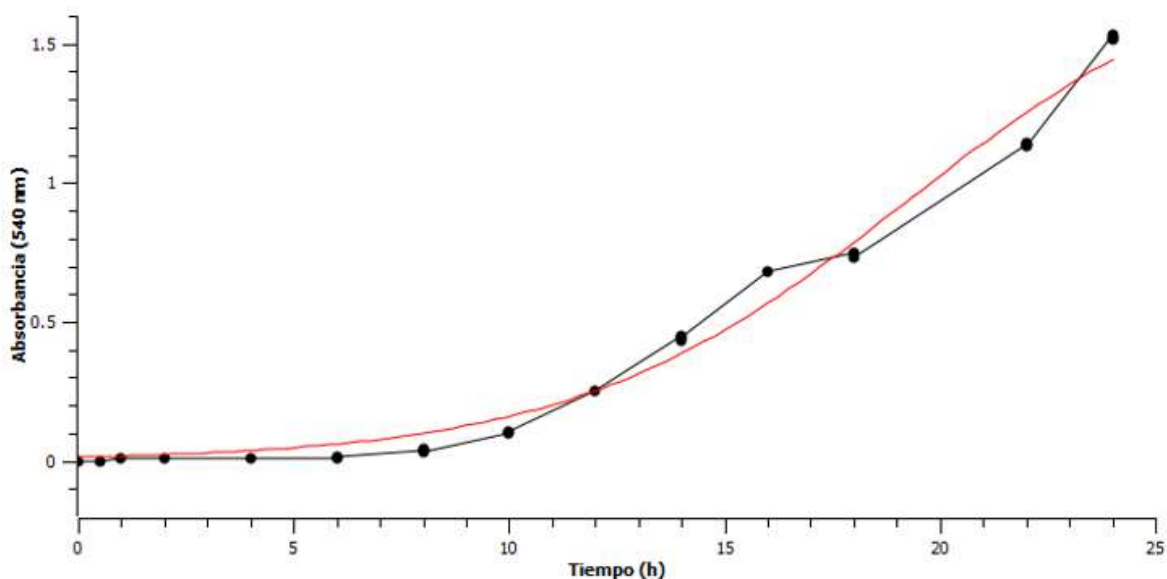


Figura 42. Cinética de crecimiento de *Pantoea stewartii* y predicción de acuerdo al modelo Verhults-Pearl

Los valores calculados para el modelo Verhults-Pearl, con un $R^2=0.9843$, fueron:

$$K=1.87039$$

$$\mu=0.2563$$

$$a=4.9369$$

obteniendo la ecuación de crecimiento para *Pantoea stewartii* en medio papa-dextrosa en las condiciones ensayadas como a continuación se muestra:

$$N = \frac{1.87039}{1 + \exp^{4.9369 - 0.2563t}}$$

Con la ecuación de crecimiento obtenida se hizo el ajuste de los datos experimentales para construir una curva normalizada de crecimiento (Figura 41). De acuerdo al modelo y datos sobre las UFC/mL en diferentes horas de crecimiento, se determinó que a las 10 horas de incubación la bacteria alcanza una población de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL encontrándose en fase exponencial de crecimiento; por ello, se estableció un tiempo de incubación de 10 horas para los bioensayos de actividad antimicrobiana.

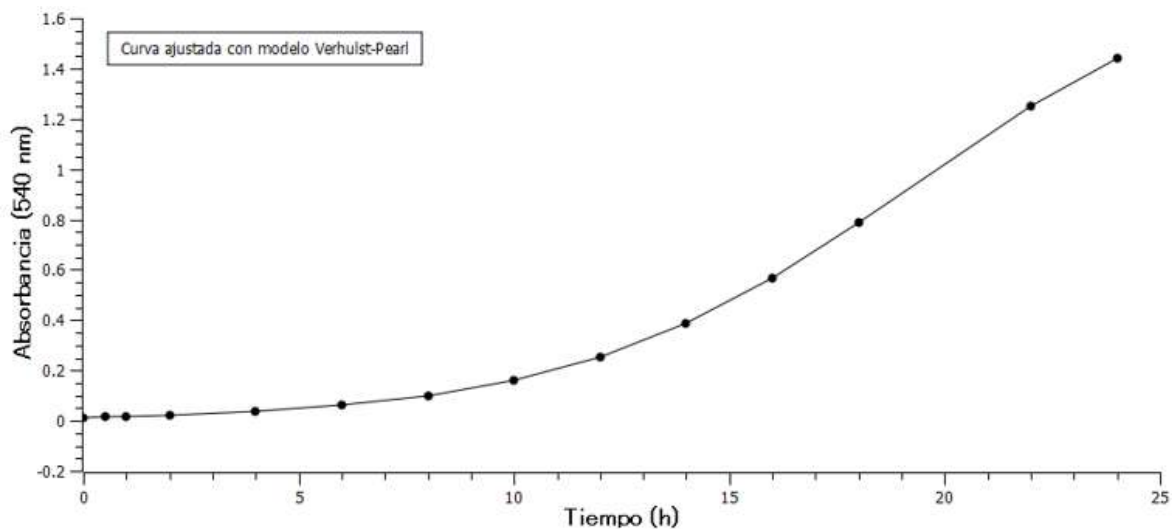


Figura 43. Curva normalizada de crecimiento de *Pantoea stewartii*

7.3.2. Inhibición del crecimiento de *Pantoea stewartii*

En la sección 7.2 se presentaron los resultados de estandarización de un método de extracción de polifenoles. Para definir el método definitivo a utilizar, se realizaron extracciones guiadas por bioensayos determinando la susceptibilidad de *Pantoea stewartii* frente a los distintos extractos ensayados. Los resultados del porcentaje de inhibición de la bacteria modelo se presentan en la Figura 44.

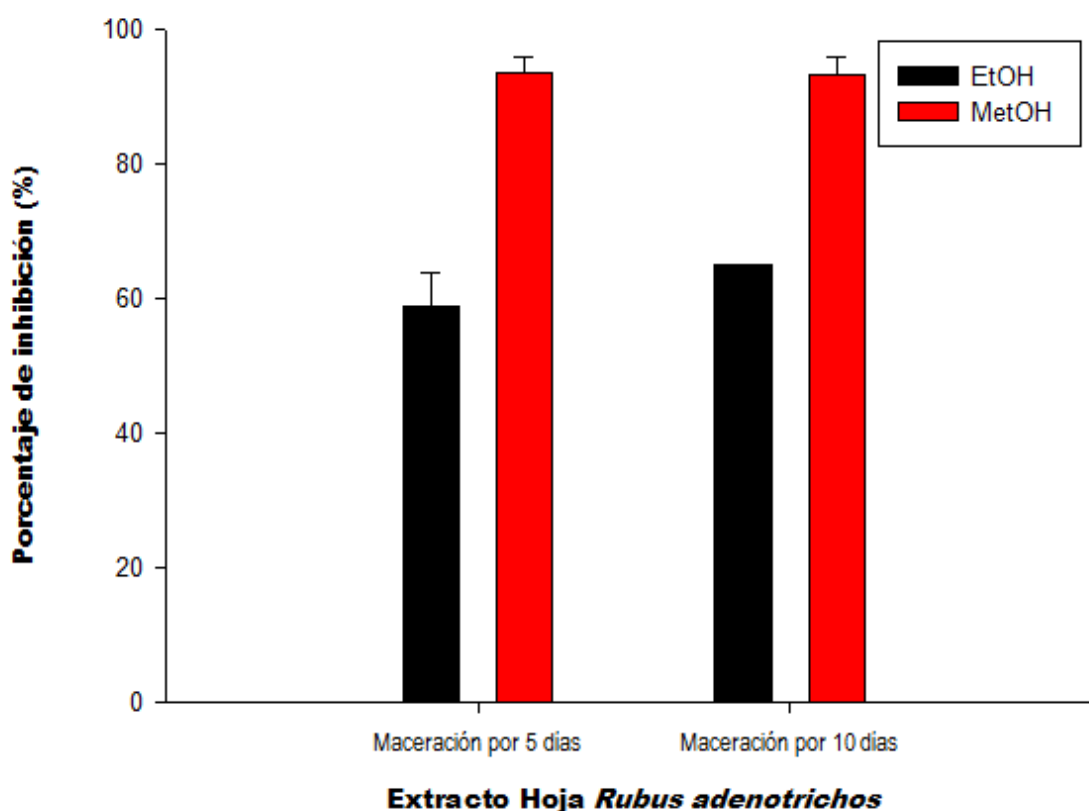


Figura 44. Efecto sobre el porcentaje de inhibición de *Pantoea stewartii* como respuesta al tipo extracto de hojas de la especie *Rubus adenotrichos*.

Los extractos etanólicos de hoja *R. adenotrichos* provocaron un 67.74 y 63.38 % de inhibición, respectivamente, mientras que para los extractos metanólicos del mismo material vegetal se registró un 93.27 y 95.73 % de inhibición de la bacteria para 5 y 10 días de maceración. A través de este análisis se determinó que los extractos metanólicos exhiben mayor bioactividad para inhibir a *Pantoea stewartii*, sin observarse diferencias significativas derivadas del tiempo de maceración del extracto ya que estadísticamente el efecto del extracto metanólico con 5 días de extracción es igual al obtenido después de 10 días. Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

Con base a estos resultados, se estableció al metanol como el extractante que permite la obtención de los compuestos más activos sin diferencias derivadas del tiempo de extracción. Posteriormente, se evaluó la actividad de extractos metanólicos obtenido por dos técnicas distintas, maceración y extracción sucesiva en equipo Soxhlet, con base a las diferencias en concentración de compuestos polifenólicos como respuesta del tipo de técnica utilizada. Los resultados se muestran en la Figura 45.

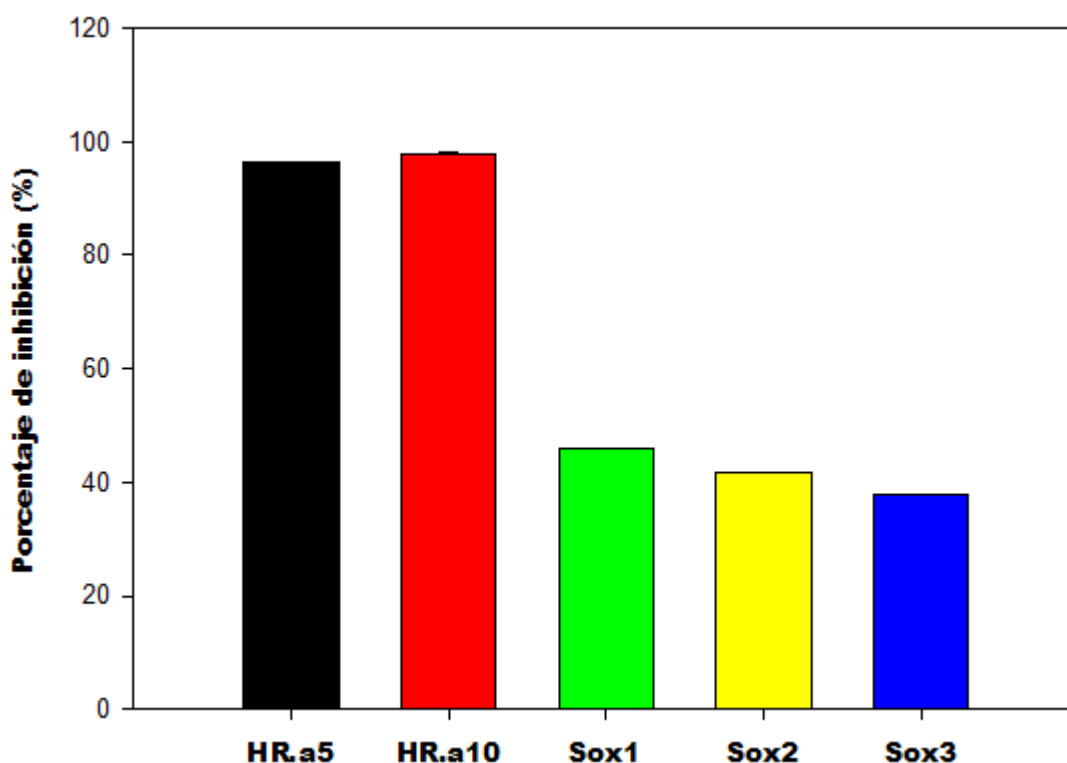


Figura 45. Porcentaje de inhibición de *Pantoea stewartii* en respuesta a distintos extractos de hoja de *Rubus adenotrichos*. HR.a5= hoja *Rubus adenotrichos* 5 días de maceración, HR.a10= hoja *Rubus adenotrichos* 10 días de maceración, Sox=hoja *Rubus adenotrichos* en extracción Soxhlet, 1-3=Repeticiones de extracción

Los extractos obtenidos por el método de maceración son claramente más activos que sus semejantes procesados en equipo Soxhlet, presentando un porcentaje de inhibición de los primeros cercano al doble del que registraron los extractos de distinto método de procesamiento. El contenido de polifenoles totales en los extractos HR es mayor que el correspondiente para Sox 1, 2 y 3, del 40 % de inhibición aproximadamente; sin embargo, no se concluye que la mayor actividad de los extractos macerados se debe al mayor contenido de polifenoles, sino que podría atribuirse a los distintos tipos de polifenoles que pudieron ser extraídos por el uso de ambas técnicas.

El método de extracción establecido para evaluar extractos por su potencial microbiano fue establecido contemplando metanol como extractante durante 5 días de maceación; por ello, se prepararon los extractos de hojas y tallos de los tres materiales silvestres de zarzamora colectados para determinar el porcentaje de inhibición de *Pantoea stewartii*

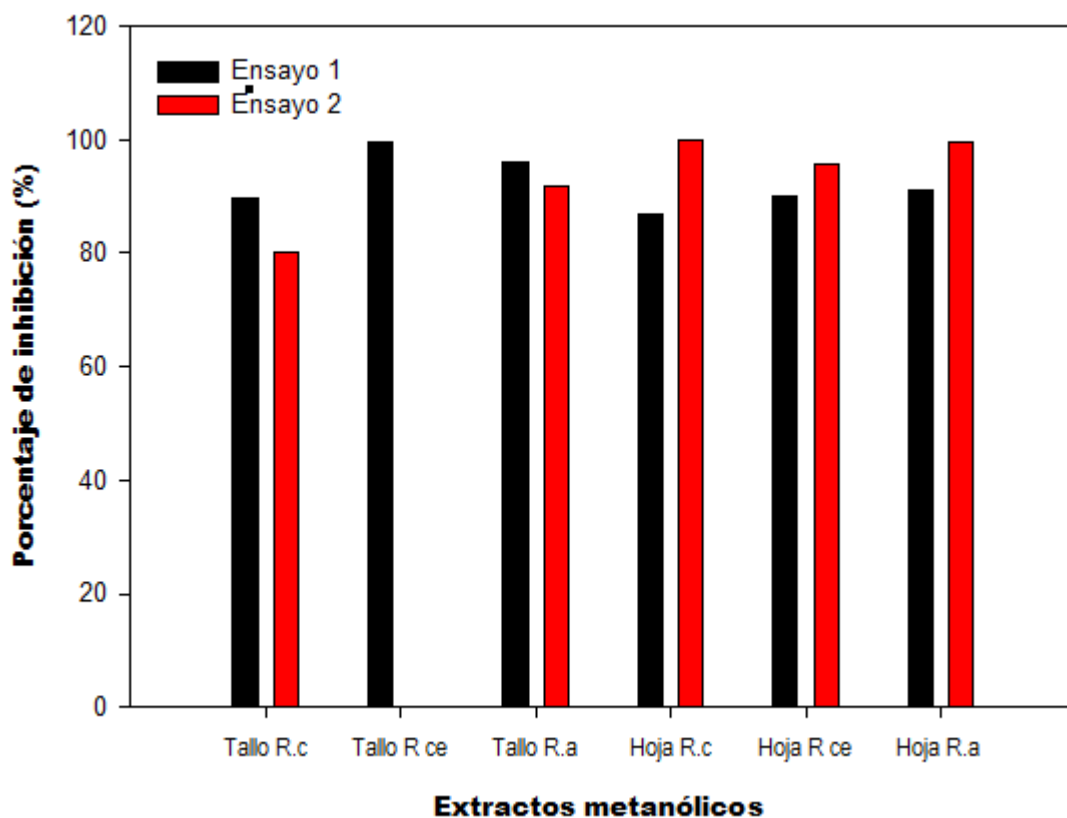


Figura 46. Porcentaje de inhibición de *Pantoea stewartii* por efecto de su exposición a extractos de hojas y tallos de tres especies silvestres de zarzamora. R.c = *Rubus coriifolius*, R.ce = morfoespecie “Cerosa”, R.a = *Rubus adenotrichus*. *En el ensayo 2 no fue posible realizar el conteo de colonias

Todos los extractos evaluados registraron más del 80 % de inhibición de la bacteria, destacando el tratamiento con extracto de tallo de *R. adenotrichus* y de la morfoespecie “Cerosa”, los cuales tiene un bajo contenido en polifenoles, y alcanzaron el 96,60 y 91.18 % de inhibición.

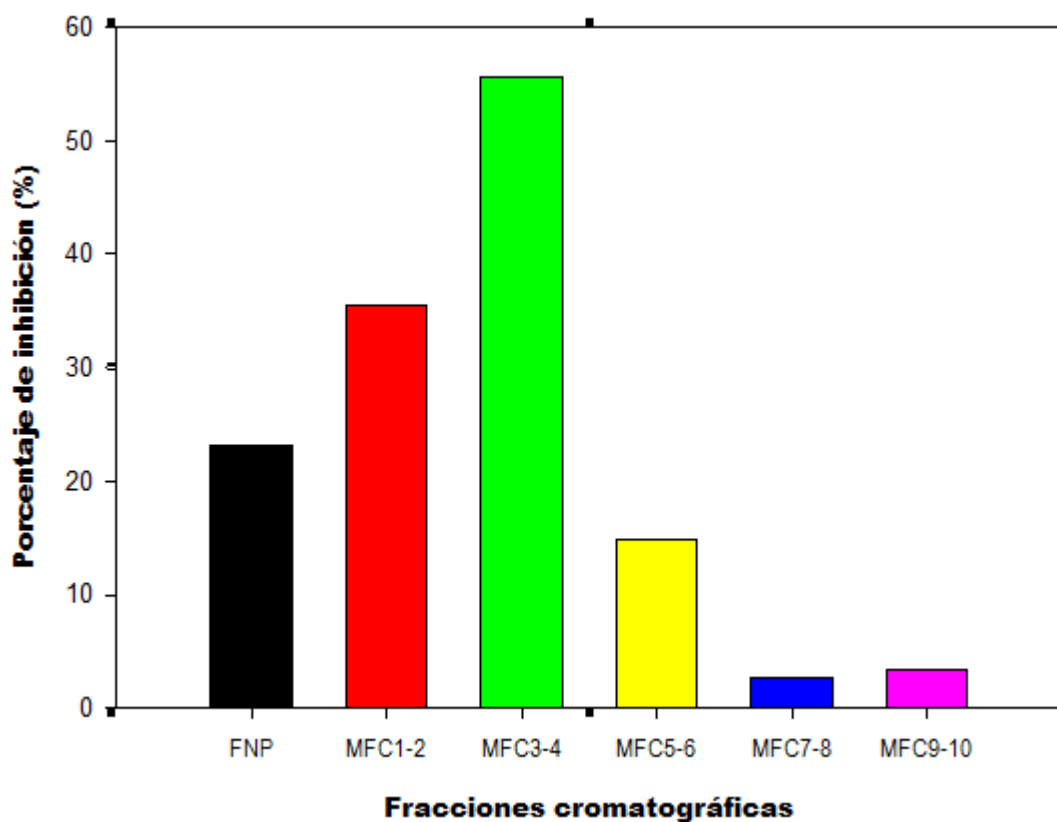


Figura 47. Inhibición de *Pantoea stewartii* por exposición a las fracciones cromatográficas post-Amberlita del extracto tallo *Rubus adenotrichos*. FNP=fracción no polifenólica, MFC=mezcla de fracciones cromatográficas polifenólicas, 1-2=fracción 1 y 2, 3-4=fracción 3 y 4, 5-6=fracción 5 y 6, 7-8=fracción 7 y 8, 9-10=fracción 9 y 10

Pocas especies del género *Rubus* han sido evaluadas con la finalidad de evidenciar su potencial antimicrobiano, tal es el caso de *Rubus chamaemorus*, *Rubus coriifolius*, *Rubus urticaefolius* y *Rubus ulmifolius*, cuyos extractos metanólicos y acuosos en distintas concentraciones han inhibido el desarrollo de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Thiem y Gonslinska, 2004; De Paula-Silva y Martins de Siqueira, 2000; Sisti *et al.*, 2008; Panizzi *et al.*; 2002; Flamini *et al.*, 2002). Sin embargo, no existe un reporte sobre el potencial antimicrobiano exhibido por plantas silvestres pertenecientes a este género con enfoque hacia el posible control biológico de microorganismo fitopatógenos, más aún con especies mexicanas

VIII. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó un protocolo de extracción de compuestos polifenólicos aplicando el método de maceración con solventes orgánicos partiendo de hojas y tallos deshidratados.
2. Bajo las condiciones de extracción ensayadas se registraron diferentes concentraciones de compuestos polifenólicos entre especies.
3. La concentración y tipo de polifenoles están ligados a la técnica y al extrante utilizados.
4. Aunque no se realizó un análisis de perfil fitoquímico, las diferencias en el grado de inhibición observadas hacen suponer que existen distintos tipos de polifenoles en los materiales colectados.
5. El extracto metanólico de tallo de *Rubus adenotrichos* resultó ser el más efectivo para la inhibición de *Pantoea stewartii*.
6. La capacidad de inhibición del extracto de tallo de *Rubus adenotrichos* permite sugerir que es debida a la acción sinérgica de los compuestos que lo integran debido a que ninguna de las fracciones derivadas de él alcanzaron el mismo porcentaje de inhibición.
7. Las investigaciones bibliográficas permiten establecer que este es el primer trabajo donde se reporta el efecto inhibitorio de extractos obtenidos a partir de especies silvestres del género *Rubus* con enfoque fitopatológico. Además, las evidencias científicas sobre la bioactividad de especies silvestres de zarzamora mexicanas son escasas o nulas, más aun considerando que en este trabajo se evaluaron dos órganos vegetales de manera independiente.
8. Los resultados mostrados en esta investigación permiten proponer a tres materiales silvestres de zarzamora, *R. coriifolius*, *R. adenotrichos* y morfoespecies "Cerosa" para su uso como fuente de compuestos con potencial antimicrobiano, pudiendo ser considerados como alternativas para el control biológicos de microorganismos fitopatógenos.

IX. PROSPECTIVAS

1. Identificar los compuestos presentes en las fracciones cromatográficas evaluadas en el presente trabajo por técnicas acopladas de HPLC-ESI-MSⁿ.
2. Realizar análisis cromatográfico en equipo UHPLC para establecer las condiciones de operación para la elución y separación de los compuestos posiblemente responsables de la bioactividad observada.
3. Determinar la efectividad los extractos crudos frente a otros microorganismos patógenos, abarcando a bacterias Gram positivas, hongos filamentosos y levaduras.
4. Evaluar la bioactividad de los extractos estableciendo curvas tiempo-muerte de bacterias fitopatógenas.
5. Determinar el efecto sinérgico de los extractos y antibióticos para el control de cepas patógenas resistentes.

X. REFERENCIAS CONSULTADAS

Akhtar, Y.; Isman, M.B.; Lee, S. G.; Lee, H. S. 2012. Toxicity of quinones against two-spotted spider mite and three species of aphids in laboratory and Green house conditions. *Ind Crop Prod*, 37: 536-541.

Akhtar, Y.; Yeoung, Y. R.; Isman, M. B. 2008. Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some comercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochem*, 7: 77-88.

Anttonen, M. J. y Karjalainen, R. O. 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J Food Comp Anal*, 18: 759-769.

Arapitsas, P. 2012. Hydrolyzable tannins. *Food Chem*, 135: 1708-1717.

Arts, I. C. W.; Van de Putte, B.; Hollman, C. H. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands: Fruits vegetables staple. *Foods and processed foods*. *J Agric Food Chem*, 48: 1746-1751.

Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 99: 191-203.

Beer, C.; Myers, R. A.; Sorenson, J. H.; Bucci, L. R. 2004. Comprehensive comparison of the antioxidant activity of fruits and vegetables based on typical serving sizes from common methods. *Curr Top Nutraceutical Res*, 2: 227-250.

Bello-González, M. A. 2007. Catálogo de plantas medicinales. INIFAP Uruapan, Mich. p 116.

Berger, R.; Lunkenbein, S.; Ströhle, A.; Hahn, A. 2012. Antioxidants in food: mere myth or magic medicine? *Crit Reviews Food Sci Nutri*, 52: 162-171.

Bidlack, W. R.; Omaye, S. T.; Topham, D. K. W. Phytochemicals as bioactive compounds. Ed. Technomic Publishing Company, Inc., EUA. 2000. pp 1-2

Bobinaité, R.; Viskelis, P.; Venskutonis, P. R. 2012. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chem*, 132: 1495-1501.

Boulekbache-Makhlouf, L.; Medouni, L.; Medouni-Adrar, S.; Arkoub, L.; Madani, K. 2013. Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the by product of eggplant. *Ind Crops Prod*, 49: 668-674.

Bowsher, C.; Steer, M.; Tobin, A. Plant biochemistry. 1ª Edición. Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, EUA, 2008. pp 26-27.

Brock Biología de los Microorganismos, 11a edición, Pearson Prentice Hall

Céspedes, C. L.; Molina, S. C.; Muñoz, E.; Lamilla, C.; Alarcón, J.; Palacios, S. M.; Carpinella, M. C.; Ávila, J. G. 2013a. The insecticidal, molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae). *Ind Crop Prod*, 42: 78-86.

Céspedes, C. L.; Muñoz, E.; Salazar, J. R.; Yamaguchi, L.; Werner, E.; Alarcón, J.; Kubo, I. 2013b. Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from *Calceolaria talcana* and *C. integrifolia* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae). *Food Chem Toxicol*, 62: 919-926.

Céspedes, C. L.; Salazar, J. R.; Ariza-Castolo, A.; Yamaguchi, L.; Ávila, J. G.; Aqueveque, P.; Kubo, I.; Alarcón, J. 2014. Biopesticides fromo plantas: *Calceolaria integrifolia* s. l. *Environ Research*, 132: 391-406.

Cieslik, E.; Greda, A.; Adamus, W. 2006. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chem*, 94: 135-142.

Clifford, M. 2000. Review anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80:1063-1072.

Comisión Nacional de Biodiversidad (CONABIO). Disponible en www.conabio.gob.mx. Consultado el 20 de julio de 2014.

Conner, W. E.; Boada, R.; Schroeder, F. C.; Gonzalez, A.; Meinwald, J.; Eisner, T. 2000. Chemical defense: bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. *Proc Nat Acad Sci*, 97: 14406-14411.

Cruz, J. R. 2007. Los citunís silvestres (*Rubus* spp.) su caracterización taxonómica y ecológica en una región del sur de la meseta Purhépecha, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p 67.

Cuevas-Rodríguez, E. O.; Dia, V. P.; Yousef, G. G.; García-Saucedo, P. A.; López-Medina, J.; Paredes-López, O.; González de Mejía, E.; Lila, M. A. 2010. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts.

Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Op Biotech*, 23:174-181.

Díaz-García, M. C.; Obón, J. M.; Castellar, M. R.; Collado, J.; Alacid, M. 2013. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chem*, 138: 938-949.

Ding, M.; Feng, R.; Wang, S. Y.; Bowman, L.; Lu, Y.; Qian, Y.; Castranova, V.; Jiang, B. H.; Shi, X. 2006. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem*, 281: 17359-17368.

Duthie, G. G.; Duthie, S. J.; Kyle, J. A. M. 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutri Res Rev*, 13: 79-106.

Egea, I.; Sánchez-Bel, P.; Romojaro, F.; Pretel, M. T. 2010. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Hum Nutr*, 65: 121-129.

Eun-Ju, J.; Myung-Suk, B.; Eun-Kyung, J.; Young-Hong, J.; Seung-Cheol, L. 2011. Antioxidant activity of different parts of eggplant. *J Med Plant Res*, 5: 4610-4615.

Fazio, A.; Plastina, P.; Meijerink, J.; Witcamp, R. F.; Gabriele, B. 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 Chem*, 140: 817-824.

Ferreira, D.; Gross, G. G.; Kolodziej, H.; Yoshida, T. 2005. Tannins and related polyphenols: fascinating natural products with diverse implications for biological systems, ecology industrial applications and health protection. *Phytochem*, 66: 1969-1971.

Ferreira, D.; Slade, C.; Marais, J. P. 2006. Flavans and proantocianidinas. En: Andersen y Markham (Eds). *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. Ed. Taylor & Francis Group, EUA. pp 553-616.

Garzón, G. A.; Riedl, K. M.; Schwartz, S. J. 2009. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andres berry (*Rubus glaucus* Benth). *J Food Sci*, 74: c227-c232.

Geissman, T. A. y Grout, D. H. G. 1969. Organic chemistry of secondary plant metabolism. Ed. Freeman Cooper & Co. pp 137-229.

González, J. A. y Esteves-Braun, A. 1998. Effect of *E*-chalcone on potato-cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*). *J Agric Food Chem*, 46: 1163-1165.

Guyton, A. C. y Hall, J. E. 2006. Tratado de Fisiología Médica. Ed. Elsevier. 11^a edición. España. pp 877-878.

Han, X.; Shen, T.; Lou, H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci*, 8: 950-988.

Hayouni, E. A.; Abedrabba, M.; Bouix, M.; Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*, 105: 1126-1134.

Howell, A. B. 2007. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Mol Nutr Food Res*, 51: 732-737.

Huang, W. Y.; Cai, Y. Z.; Zhang, Y. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutri Cancer*, 62: 1-20.

Hussain, T.; Gupta, S.; Adhami, V. M.; Mukhtar, H. 2005. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*, 113: 660-669.

Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agricultura and an increasing regulated world. *Ann Rev Entomol*, 51, 45-66.

Juranic, Z. y Zixack, Z. 2005. Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. *Bioeffectors*, 23: 207-211.

Katsub, W.; Iwashita, K.; Tsushida, T.; Yamaki, K.; Kobori, M. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 51: 68-75.

Kellogg, J.; Wang, J.; Flint, C.; Ribnicky, D.; Kuhn, P.; Gonzalez de Mejia, E.; Raskin, I.; Lila, M. A. 2010. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *J Agric Food Chem*, 58: 3884-3900.

Kessler, A. y Balwin, I. T. 2002. Plant response to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Ann Rev Plant Biol*, 53: 299-328.

Komes, D.; Belščak-Cvitanović, A.; Ljubičić, I.; Durgo, K.; Cindrić, I. J.; Bušić, A.; Vojvodić, A. 2014. Formulating blackberry leaf mixtures for preparation of infusions with plant derived sources of sweeteners. *Food Chem*, 151: 385-393.

Kong, A. N.; Yu, R.; Chen, C.; Mandlekar, S.; Primiano, T. 2000. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm*, 23: 1-16.

Kubo, I. 1997. Tyrosinase inhibitors from plants. En: Hedin, P.; Hollingworth, R.; Masler, E.; Miyamoto, J.; Thompson, D (Eds). *Phytochemicals for pest control*. ACS Symposium Series 658. American Chemical Society, Washington DC. pp 310-326.

López-Luengo, M. T. 2002. Flavonoides. *Fitoterapia*, 21: 108-116.

Määttä-Riihinen, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Törrönen, A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *J Agric Food Chem*, 52: 6178-6187.

Macías, F. A.; Galindo, J. L. G.; Galindo, J. C. G. 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochem*, 68: 2917-2936.

Martínez-Valverde, I.; Peragio, M. J.; Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch Latin Nutri*, 50: 5-18.

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. *J Agric Food Chem*, 55: 8616-8624.

Monasterio-Huelin, M. E. 1992. Revisión taxonómica del género *Rubus* L. (Rosaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Farmacia. Departamento de Biología Vegetal. Universidad Complutense de Madrid. España. p 217.

Muñoz, E.; Escalona, D.; Salazar, J. R.; Alarcón, J.; Céspedes, C. L. 2013b. Insect growth regulatory effects by diterpenes from *Calceolaria talcana* Grau & Ehrhart

(Calceolariaceae: Scrophulariaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Drosophila melanogaster*. *Ind Crop Prod*, 45:283-292.

Muñoz, E.; Lamilla, C.; Marín, J. C.; Alarcón, J.; Céspedes, C. L. 2013a. Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. *Ind Crop Prod*, 42: 137-144.

Naasani, I.; Oh-Hashi, F.; Oh-Hara, T.; Feng, W. Y.; Johnston, J.; Chan, K.; Tsuruo, T. 2003. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, 63: 824-830.

Negri, G. y Tabach, R. 2013. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. *Rev Bras Farmacogn*, 23: 851-860.

Nisha, P.; Abdul-Nazar, P.; Jayamurthy, P. 2009. A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food Chem Toxicol*, 47: 2640-2644.

O'leary, K. A.; De Pascual-Tereasa, S.; Needs, P. W.; Bao, Y. P.; O'Brien, N. M.; Williamson, G. 2004. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res*, 551: 245-254.

Panizzi, L.; Caponi, C.; Catalano, S.; Cioni, P. L.; Morelli, I. 2002. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharm*, 79: 165-168.

Paredes-López, O.; Cervantes-Ceja, M. L.; Vigna-Pérez, M.; Hernández-Pérez, T. 2010. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life-A review. *Plant Foods Hum Nutri*, 65, 299-308.

Petty, S. y Scully, C. 2009. Polyphenols, oral health and disease: a review. *J Dent*, 37: 413-423.

Proestos, C. y Komaitis, M. 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT*, 41: 652-659.

Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H. L.; Oksman-Caldentey, K. M. 2005. Bioactive berry compounds-novel tolos against human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 8-18

Randhir, R.; Lin, Y. T.; Shetty, K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac J Clin Nutri*, 13: 295-307.

- Rezzonico F., Vogel G., Duffy B. y Tonolla M. 2010. Application of Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification and Clustering Analysis of *Pantoea* Species. *App Environ Microbiol*, 76: 4497–4509.
- Rice, L. B. 2003. Do we really need new antiinfective drugs? *Curr Opin Pharmacol*, 3: 459-463.
- Roper, C. M. 2011. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol Plant Path*, 12: 628–637.
- Roopchand, D. E.; Krueger, C. G.; Moskal, K.; Fridlender, B.; Lila, M. A.; Raskin, I. 2013. Food-compatible method for the efficient extraction and stabilization of cranberry pomace polyphenols. *Food Chem*, 141: 3664-3669.
- Rzedowski, J. y Calderón, R. G. 2005. Rosaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes, Fascículo 135, Co-edición entre el Instituto de Ecología, A.C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Morelia, Michoacán. pp 123-143.
- Sadik, C. D.; Sies, H.; Schewe, T. 2003. Inhibition of 15-lipooxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol*, 65: 773-781.
- Sánchez, S. O. 1974. La Flora del Valle de México. Ed. Litocare. Cuernavaca, Edo. De México, México. pp 196-198.
- Schieber, A.; Stintzing, F. C.; Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci Technol*, 12: 401-413.
- Schreckinger, M. E.; Lotton, J.; Lila, M. A.; Gonzales De Mejia, E. 2010. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential and commercialization. *J Med Food*, 13: 233-246.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Disponible en www.sagarpa.gob.mx. Consultado el 31 de julio de 2014.
- Seeram, N. P. 2006. Berries. En: Heber, D.; Blackburn, G.; Go, V. L. M.; Milner, J. Nutritional Oncology. Segunda edición. Londres, Ing. Academic Press. pp 615-25.
- Seeram, N. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem*, 56: 627-629.

Serrano, J.; Puupponen-Pimia, R.; Dauer, A.; Aura, A. M.; Saura-Calixto, F. 2009. Review tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*, 53: 310-329.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Disponible en www.siap.gob.mx. Consultado el 31 de julio de 2014.

Simirgiotis, M. J. y Schmeda-Hirschmann, G. 2010. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the White strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. *J Food Comp Anal*, 23: 545-553.

Siriwoharn, T.; Wroslad, R. E.; Finn, C. E.; Pereira, C. B. 2004. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenols, and antioxidant properties. *J Agric Food Chem*, 52: 8021-8030.

Song, J. H. 2008. What's new on the antimicrobial horizon? *Int J Antimicrob Agents*, 32: S207-S213.

Spencer, J. P.; Rice-Evans, C.; Williams, R. J. 2003. Modulation of prosurvival Akt/protein kinase B and ER K1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem*, 278: 34783-34793.

Surh, Y. J.; Na, H. K.; Lee, J. Y.; Keum, Y. S. 2001. Molecular mechanisms underlying antitumor promoting activities of heat-processed Panax ginseng CH Meyer. *J Korean Med Sci*, 16: S38-S41.

Szajdek, A. y Borowska, E. J. 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutri*, 63: 147-156.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Plant physiology. Ed. Sinauer Associates Inc. Segunda edición, EUA. pp 500-600.

Tavares, L.; Figueira, I.; Macedo, D.; McDougall, G. J.; Leitão, M. C.; Vieira, H. L. A.; Stewart, D.; Alves, P. M.; Ferreira, R. B.; Santos, C. N. 2012. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 131: 1443-1452.

Tulipani, S.; Mezzetti, B.; Capocasa, F.; Bompadre S.; Beekwilder, J.; Ric de Vos, C. H. 2008. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agric Food Chem*, 56: 696-704.

United States Department of Agriculture (USDA). Disponible en www.usda.gov. Consultado el 25 de julio de 2014.

Valant-Vetschera, K. M y Wallenweber, E. Flavones and flavonols. En: Anderson, O. M.; Markham, K. R. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press/Taylor & Francis Group, EUA. pp 618-748.

Vanaclocha, B. A. y Cañigueral, S. 2003. Fitoterapia: vandémecum de prescripción. Ed. Masson. Cuarta Edición. España. p 291.

Venskutonis, P.; Dvaranauskaite, A.; Labokas, J. 2007. Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania. *Fitoterapia*, 78: 162-165.

Vrhousek, U.; Palchetti, A.; Reniero, F.; Guillou, C.; Masuero, D.; Mattiri, F. 2006. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *J Agric Food Chem*, 54: 4469-4475.

Wang, S. Y. y Jiao, H. J. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem*, 48: 5677-5684.

Wenzel, R. P. 2004. The antibiotic pipeline-challenges, costs, and values. *N. Engl J Med*, 351: 523-526.

Williams, C. A. Flavone and flavonol O-glicósidos. En: Anderson, O. M.; Markham, K. R. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press/Taylor & Francis Group, EUA. pp 749-856.

Wink, M. 2000. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Ed. CRC Press LLC, EUA. pp 1-14.

Zafra-Stone. 2007. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutri Food Res*, 51: 675-683.

Zhao, Y. 2007. Berry fruit value-added products for health promotion. Boca Raton, FI. CRC Press.