

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO BIOLÓGICO DEL MATERIAL
VEGETAL OBTENIDO POR MICROPROPAGACIÓN
(CALLOS) DE *Rubus liebmannii*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

EDGAR ENRIQUE LÓPEZ FONSECA

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Maria Isabel Aguilar Laurents

Vocal Rachel Mata Essayag

Secretario Maria Adelina Jiménez Arellanes

1er sup. José Fausto Rivero Cruz

2do sup. Maria Isabel Rivero Cruz

**Unidad de Investigación Médica de Farmacología
de Productos Naturales, Hospital de Pediatría,
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

Asesor: Maria Adelina Jiménez Arellanes _____

Sustentante: Edgar Enrique López Fonseca _____

AGRADECIMIENTOS

- Al Fondo de Fomento a la Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS) por el financiamiento otorgado al proyecto objeto de esta tesis No. 2006/1B)/I/006. “Evaluación farmacológica y química de la especie *Rubus liebmannii* micropropagada y cultivo de callos”.
- Al Fondo de Fomento a la Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS), por la beca otorgada a través del proyecto No. 2006/1B)/I/006. “Evaluación farmacológica y química de la especie *Rubus liebmannii* micropropagada y cultivo de callos”.
- A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes por la dirección de este proyecto, por todo el apoyo, paciencia y comprensión que me ha otorgado y lo que le falta.
- A la jefa de la UIM-FPN, Dra. Mariana Meckes Fischer, por haberme permitido formar parte de su gran grupo de trabajo, así como el apoyo para la determinación de la actividad antiespasmódica de este proyecto.
- Al Dr. Jaime Tortoriello García y la M. en C. Pilar Nicasio Torres, por proporcionar el material (callos) de la planta objeto de estudio.
- A la Dra. Adriana Becerril Montes del Laboratorio, por la asesoría para realizar los estudios histopatológicos.
- Al M. en C. Jorge Comejo por su colaboración en la determinación de los parámetros bioquímicos e histopatológicos y por todo el apoyo que me brindo en la elaboración de este proyecto.

➤ A mis compañeras, Rosalba, Arlene, Mónica por su colaboración en la determinación de los experimentos de toxicidad aguda y subaguda.

➤ A los miembros de mi jurado:

Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents.

Dra. Rachel Mata Essyag.

Dr. Jose Fausto Rivero Cruz.

Dra. Maria Isabel Rivero Cruz.

Por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo, y a sus comentarios y sugerencias.

DEDICATORIAS.

- A mis padres Juan y Margarita por todo el apoyo y cariño que siempre me han brindado, por hacerme quien soy, y creer incondicionalmente en mí.

- A mis hermanos Beatriz Jocelyn, Juan Francisco y Jorge Ángel con los cuales he compartido momentos inolvidables.

- A Rocio, por todo el apoyo, comprensión, consejos y por compartir momentos inolvidables a mi lado.

- A la Dra. Adelina por toda la paciencia que la verdad si fue mucha, por la comprensión y por todo el apoyo que me brindo en el desarrollo de este trabajo.

- A el M. en C. Jorge, por la amistad y apoyo que me brindo durante y después de mi estancia en el laboratorio.

ÍNDICE.

Resumen.....	1
Antecedentes del Género <i>Rubus</i>	2
Importancia de los Procesos Biotecnológicos para la Producción de Plantas Medicinales.....	14
Objetivo.....	21
Metodología.....	22
Resultados y Discusión.....	36
Conclusión.....	59
Referencias Bibliográficas.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>R. liebmannii</i> en el territorio Mexicano.	3
Figura 2. Partes aéreas, flores y frutos de la especie <i>Rubus liebmannii</i> (Herbario de CMN Siglo XXI).	5
Figura 3. Callos de <i>Rubus liebmannii</i> , obtenidos por micropropagación.	19
Figura 4. Microcorte sagital de la parte media del lóbulo derecho del hígado de 8 μ m Tinción: hematoxilina-eosina. De ratas SD (σ) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	47
Figura 5. Microcorte transversal de íleon de 8 μ m Tinción: hematoxilina-eosina. De ratas SD (σ) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	49
Figura 6. Microcorte transversal de la parte media del bazo de 8 μ m Tinción: hematoxilina-eosina. De ratas SD (σ) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	50
Figura 7. Perfil cromatográfico de F3, F4, F5 y F6 del fraccionamiento primario del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	54
Figura 8. Perfil cromatográfico de las bandas obtenidas en las TLC's, identificación de β -sitosterol en las bandas C y B. Y perfil cromatográfico de la fracción obtenida de la acetilación.	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antiprotozoaria del extracto y de compuestos puros obtenidos del extracto CH ₂ Cl ₂ :MeOH de <i>R. coriifolius</i> (Alanis et al., 2003).	11
Tabla 2. Medio de cultivo (Murashige y Skoog) empleado para la micropropagación de los callos de <i>R. liebmannii</i> .	22
Tabla 3. Fraccionamiento primario del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	25
Tabla 4. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F5.	26
Tabla 5. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F5-6.	27
Tabla 6. Rendimiento de extractos etanólicos de callos obtenidos de pecíolo y hojas de <i>R. liebmannii</i> .	38
Tabla 7. Evaluación de la actividad antibacteriana, antifúngica y espasmolítica en ileon de cobayo del extracto EtOH de <i>R. liebmannii</i> .	38
Tabla 8. DL ₅₀ del extracto EtOH de <i>R. liebmannii</i> en ratones y ratas.	39
Tabla 9. Evaluación de la toxicidad sub-aguda del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> . Seguimiento del aumento de peso corporal por semana, durante la evaluación.	40
Tabla 10. Evaluación de la toxicidad sub-aguda del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> . Peso de órganos (g).	42

Tabla 11. Valores obtenidos de química sanguínea de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	44
Tabla 12. Evaluación de la toxicidad sub-aguda del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> . Cuenta diferencial de células blancas de ratas SD (♂).	45
Tabla 13 Fraccionamiento primario del extracto EtOH de <i>R. liebmannii</i> .	51
Tabla 14. Actividad antibacteriana y antifúngica de las fracciones primarias de <i>R. liebmannii</i> .	52
Tabla 15. Actividad espasmolítica de las fracciones primarias de <i>R. liebmannii</i> .	53
Tabla 16. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F5 del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	55
Tabla 17. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F5-6, del extracto EtOH de <i>R. liebmannii</i> .	56
Tabla 18. . Pesos de las bandas obtenidas de las TLC's de las fracciones terciarias F5-6-5 y F5-6-6, del extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	57
Tabla 19. Pesos de las bandas obtenidas de la TLC de la fracción F5-6-5-A.	57

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Variación de peso semanal de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda, tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	41
Gráfica 2. Variación del peso relativo de los órganos de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda, tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	42
Gráfica 3 Valores obtenidos de la química sanguínea de de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	44
Gráfica 4. Valores obtenidos de la química sanguínea de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de <i>R. liebmannii</i> .	45
Grafica 5. Valores obtenidos en el estudio de la biometría hemática de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda del extracto EtOH de <i>R. liebmannii</i> .	46

RESUMEN

Algunas especies del género *Rubus* son de gran importancia en la medicina tradicional de México y en diversas partes del mundo. Investigaciones previas han demostrado su potencial biológico, por biosintetizar compuestos con efecto antioxidante, antiprotozoario, antibacteriano, antiinflamatorio y antiviral. Así también, se han realizado investigaciones desde el punto de vista químico-biológico de algunas especies y se reporta la presencia de polifenoles (epicatequina, catequina), flavonas, esteroides y triterpenos; los cuales son responsables de diversos efectos biológicos. Dado el potencial biológico del género *Rubus*, se seleccionó *R. liebmannii* para realizar el estudio químico-biológico y toxicológico de los callos. Por otra parte es importante mencionar, que el contenido de metabolitos secundarios farmacológicamente activos en algunas especies vegetales es bajo; constituyendo una limitante para realizar estudios biológicos posteriores. Actualmente, se cuenta con diversos procesos biotecnológicos que permiten inducir la biosíntesis de ciertos metabolitos secundarios de interés farmacológico; empleando esta herramienta se indujo la producción de callos de hojas y pecíolo de *R. liebmannii*. Del material vegetal colectado en Ozumba, Estado de México se obtuvieron las hojas y pecíolo, de los cuales se obtuvieron los callos en dos diferentes medios de cultivo. Posteriormente, los callos fueron retirados del medio y se pusieron a secar y se preparó el extracto etanólico de cada uno, vía maceración. Ambos extractos fueron sometidos a evaluación biológica, encontrándose que presentaban moderada actividad antifúngica, espasmolítica y nulo efecto antibacteriano *in vitro* y tóxico en roedores. El fraccionamiento químico-bio-dirigido permitió encontrar la fracción más activa. De la fracción activa se logró aislar un

triterpeno y el β -sitosterol. El efecto antimicrobiano se determinó sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, una levadura y dos especies de hongos. El efecto espasmolítico se determinó sobre ileón de cobayo, la DL₅₀ se determino sobre ratones Balb C y ratas Sprague Dawley de ambos sexos y la toxicidad sub-aguda fue determinada en ratas SD, administrando el extracto por vía intragástrica.

ANTECEDENTES DEL GÉNERO *Rubus*

a) ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTANICOS DE *R. liebmannii*.

El género *Rubus* (*Rosaceae*) está constituido por aproximadamente 250 especies, que se distribuyen principalmente en climas templados (Byamukama et al., 2005). Algunas especies de este género son de importancia industrial, alimentaria y farmacéutica por su contenido de agentes antioxidantes (Gudej y Tomczyk, 2004). Los frutos contienen vitamina A, B y C y las partes aéreas de algunas especies tienen propiedades medicinales (Byamukama et al., 2005). En México se encuentran 28 especies, siendo algunas nativas (Rzedowski y Rzedowski, 1981, Berlin et al., 1996; Standely, 1997) como *R. liebmannii*. Esta especie se distribuye principalmente en el Estado de México (Cerro Penacho, al este de Amecameca, Municipio Villa Nicolás Romero), Hidalgo (alrededores de Zacualtilpán), Oaxaca (Municipio de San Francisco Usila, Tuxtepec), Morelos (Tres Marías, Rancho San Lorenzo), Guerrero (Taxco de Alarcón y Chilpancingo), Distrito Federal (Magdalena Contreras y Cuajimalpa), Durango (Municipio de Canelas), Michoacán (Municipio de Tangamandapio, Zamora) y en Jalisco (Figura 1) (Aguilar et al., 1994, Rzedowski y Rzedowski, 1981); Herbario Nacional, Instituto de Biología, MEXU, UNAM, Agosto 2007;

http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast; SEMARNAT (Secretaría de medio ambiente y recursos naturales).



Figura 1. Distribución de *R. liebmannii* en el territorio Mexicano.

Rubus liebmannii Focke (Figura 2), es un arbusto de 1 a 4 m de alto, semitrepador, con espinas cortas, algo curvadas, pubescencia de pelos largos y cortos, a veces ausentes en tallos maduros, especialmente densa en las partes jóvenes (inclusive hojas), donde a veces se presentan pequeñas glándulas rojas sésiles o cortamente estipitadas; estípulas satáceas, de 7 a 10 (a 15) mm de largo; pecíolos pubescentes, espinosos de 4 a 6 cm de largo; hojas por lo general trifolioladas, a veces simples o 5-folioladas; folíolos ovados a lanceolados, en ocasiones con tendencia a lobularse, de (3) 4 a 10 (15) cm de largo por 2 a 6 (10) cm de ancho, acuminados, borde con dientes irregulares, doblemente aserrado, láminas por lo general poco pubescentes en ambas caras, pero a veces llegando a ser blanco-tomentosas en el envés; pecíolulo del folíolo terminal de 2 a 3 cm de largo, folíolos laterales más chicos

y subsésiles; ramas florales densamente pubescentes, con espinas muy pequeñas, curvadas; cimas umbeliformes cortas, terminales y axilares, por lo común de 1 a 6 flores, pedicelos y cálices tomentosos y con glándulas rojizas sésiles o cortamente estipitadas; sépalos extendidos o reflejos, ovado-lanceolados, acuminados, de 5 a 8 mm de largo; pétalos blancos (a veces rosa en ejemplares secos), ovales, de más o menos el mismo largo que los sépalos; fruto agregado globoso-aplastados hasta de 1.5 cm de diámetro, negruzco; drupillas numerosas, tomentosas. Probablemente esta especie corresponde a la que Reiche menciona como *R. adenotrichus* Cham (Rzedowski y Rzedowski, 1981).

En la medicina tradicional de México, la infusión de las hojas se emplea para tratar tos, nervios e insomnio y la infusión de las hojas tiernas se utiliza para tratar la disentería. La planta es conocida comúnmente como citun-zarza, tsituni (lengua purépecha), tunita del cerro, zarzamora, zarza (Aguilar et al., 1994).





Figura 2. Partes aéreas, flores y frutos de *Rubus liebmannii*. (Herbario de CMN Siglo XXI)

b). ANTECEDENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO *Rubus*

El género *Rubus* es de gran importancia, por su contenido de compuestos activos. Este género es una fuente importante de antocianinas, flavonoides, taninos, polifenoles, triterpenos (Byamukama et al., 2005; Durham et al., 1994, 1996; Zhou et al., 1992; Lien et al., 1999). Del aceite esencial de *R. rosifolius* se aisló e identificó pregeijereno, β -cariofileno, humuleno, dihidroagarofurano, hedicariol y un epieudesmol identificado como rosifoliol (Southwell, 1978). Del extracto metanólico (MeOH) de las hojas de *R. acumminatus* fueron aislados nigaichigosido F1, traquelosperogenina B, traquelosperosido B-1, β -D-glucosil ester de traquelosperogenina B, sericosido y el 4-epi-nigaichigósido. Del extracto MeOH de las hojas de *R. multibreatus* fueron aislados nigaichigósido F1, arjunglucósido I (4-epi-sericósido). De las hojas de *R. ellipticus* I (extracto MeOH) fueron aislados nigaichigósido F1, sericósido, tormentato glucosil, kaki-ichigósido F1 y 24-desoxi-sericósido (Zhou et al., 1992). De las hojas de *R. suavissimus* se aislaron diterpenos glicosilados tipo kaureno; de *R. chingii* diterpenos glicosilados de tipo labdano (Zhou et al., 1992). De las raíces de *R. pinfaensis* se aisló ácido ursólico, ácido euscáfico, ácido torméntico, ácido 19 α -

hidroxiasíatico, glucosil pinfaensato, ácido pinfaénico y metil diacetilpinfaensato (Durham et al., 1994). Otra referencia más reciente sobre la raíz de *R. pinfaensis* reportó el aislamiento del ácido 28-glucopiranosil-2 α ,3 β ,23-trihidroxiurs-12,18-dien-28-oico y el ácido 28-glucopiranosil-2 α ,3 β ,23-trihidroxiurs-12,19-dien-28-oico (Durham et al., 1996). Del extracto MeOH de las partes aéreas de *R. xanthocarpus* se aisló el ácido 1 α ,2 α ,3 β ,19 α -tetrahidroxiurs-12-en-28-oico, ester del ácido 28-O- β -D-glucopiranosil 2 α ,3 α ,19 α ,24-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico, ester del ácido 28-O- β -D-glucopiranosil 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiurs-12-en-24-formil-28-oico, ácido 2,3-O-isopropilidenil-2 α -3 α -19 α -trihidroxiurs-12-en-28-oico, metil 2 α ,3 α ,19 α ,23-tetrahidroxiurs-12-en-28-oato, ácido 2 α ,3 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-28-oico, dimetil 2 α ,3 β , 19 α -trihidroxiurs-12-en-24,28-dioato y 2 α ,3 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-24,28-dioico ácido-24-metil ester-28-O- β -D-glucopiranosil (Li et al., 1998). Del extracto MeOH (95%) de las hojas de *R. cochinchinensis* se aislaron el ácido ursólico, 2-oxo-pomólico, ácido torméntico, suavissimósido F1, 2-acetilsuavissimosido F1 y epicatequina (Lien et al., 1999). Del extracto metanólico de las partes aéreas de *R. ulmifolius* se aislaron tres nuevas antronas: rubantrona A, B y C (Flamini et al., 2002). De una extracción de las hojas, ramas y flores de *R. ulmifolius* se aislaron e identificaron diferentes compuestos; del extracto n-hexano se obtuvieron: ácidos grasos de C16 a C24, hidrocarburos de C13 a C33, alcoholes alifáticos de C18 a C24, esteroides y trazas de triterpenos; del extracto CHCl₃ y CHCl₃:MeOH (9:1) se aislaron: ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido torméntico, ácido euscápico, corosino, ácido 23-hidroxi torméntico; Del extracto metanólico de los frutos de *R. legheniensis*, se aislaron dos triterpenos glucosilados los cuales se identificaron

como: niga-ichigosido F1 y el rubussido A (Ono et al., 2003). De algunas especies de *Rubus* se reporta la cuantificación de quercetina, kaempferol, ácido elágico y su contenido de taninos, por cromatografía de líquidos de alta resolución –HPLC- (Gudej y Tomozyk, 2004). Del extracto MeOH (con 1% de ácido trifluoroacético) del fruto de *R. pinnatus* y *R. rigidus*, se aislaron 3-(6"-*O*- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosil) cianidina y 3-*O*- β -glucopiranosido cianidina (Byamukama et al., 2005). En un estudio en el cual se evaluó el grado de polimerización del extracto MeOH al 60% de los frutos de *R. ellagitannins*, se logró purificar e identificar el ácido elágico, metil galato y el metil sanguisorbato, los cuales fueron productos de hidrólisis (Vrhovsek et al., 2006). Del extracto acetónico de los frutos de *R. loganbaccus* y *R. baileyanus*, se reportó la presencia de antocianinas y compuestos fenólicos, de los cuales se identificó que la mayor proporción correspondía a rutinosil y a soforosil glicósido; otros compuestos que se encontraban en menor proporción fueron: cianidin-3-[2-(glucosil)glucósido, cianidin-3-[2-(glucosil)-6-(ramnosil)-glucósido] y cianidin-3-[6-(ramnosil)-glucósido] (McGhie et al., 2006). Del extracto realizado con una mezcla de HCl 1.5 M- EtOH al 95% (15:85) de los frutos de *R. idaeus*, se lograron purificar 12 tipos de antocianinas, siendo las principales cianidin-3-sophorósido, cianidin-3-(2^G-glucosilrutinosido), cianidin-3-sambubiosido, cianidin-3-rutinosido, cianidin-3-xilosilrutinosido cianidin-3-(2^G-glucosilrutinosido), y cianidin-3-rutinósido. Otros 5 tipos de antocianinas se encontraron en menor proporción, de las cuales una de ellas se identificó como pelargonidin-3-rutinósido, las cuatro restantes faltan por identificarse pero sus agliconas fueron identificadas como pelargonina, petunidina, delfindina y malvidina (Chen et al., 2007). De los extractos CH₂Cl₂:MeOH y EtOH de *R.*

corifolius y *R. liebmannii* (material silvestres), respectivamente se aisló (-)-epicatequina, (+)-catequina, nigaichigosido, β -sitosterol, ácido gálico, ácido elágico, ácido 3,4-hidroxibenzoico y escualeno (Alanis et al., 2003; Romero, 2008). Un trabajo reciente sobre material micropropagado de *R. liebmannii* (extracto EtOH) se reporta la presencia de (-)-epicatequina y nigaichigosido F1 (Cornejo, 20008).

c). ANTECEDENTES BIOLOGICOS.

El genero *Rubus* ha sido en los últimos años, objeto de numerosos estudios debido a su importancia en la industria y en la medicina tradicional, por lo que se han investigado diversas especies de este género, para purificar e identificar compuestos con alguna actividad biológica de importancia para la salud. A continuación se describen los efectos biológicos reportados para algunas especies del género. El extracto hexánico de *R. brasiliensis* induce ansiolisis en roedores y este extracto indujo un efecto hipnótico, anticonvulsivo y relajante muscular en ratón a una dosis de 300 mg/kg. Los autores concluyeron que el extracto puede actuar como agonista del complejo receptor GABA_A-benzodiazepina (Nogueira y Vassilieff, 2000). El extracto acuoso de los frutos de *R. coreanus* mostró un efecto contra el virus de hepatitis B (VHB) y este presentó una concentración efectiva cincuenta (CE₅₀) mayor de 128 μ g/mL (Kim et al., 2001). Los extractos hexánico, acetato de etilo, clorofórmico y metanólico de las hojas de *R. idaeus* mostraron efecto relajante en el modelo *in vitro* del ileon de cobayo y conforme aumentó la polaridad del extracto, la actividad relajante se incrementó, resultando más activo el extracto metanólico (Rojas-Vera et al., 2002). En una evaluación de la actividad antioxidante de cinco especies de *Rubus* (*R. laciniatus*, *R. ursinus*, *R. ursinus x idaeus*, *R.*

idaeus y *R. occidentalis*), se encontró que estas especies tienen una significativa actividad antioxidante y que son ricas en compuestos fenólicos y antocianinas (Wada y Ou, 2002). En un estudio que se realizó al extracto metanólico de las partes aéreas de *R. ulmifolius* se aislaron tres nuevas antronas: rubantrona A, B y C. Estas tres rubantronas se sometieron a un análisis microbiano contra *Staphylococcus aureus*, resultando la rubantrona A activa con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4.5 mg/mL (Flamini et al., 2002). En otro estudio realizado al extracto metanólico de los frutos de *R. coreanus*, recolectados en las montañas de Chiak, Korea (en Julio, 1998), se aislaron y purificaron dos compuestos, el nigaichigósido F1 y el ácido 23-hidroxitorméntico, a los cuales se les evaluó su efecto antiinflamatorio y analgésico en el modelo de inducción del edema en ratas con carragenina y el modelo de inducción de la permeabilidad vascular en ratón inducido con ácido acético, y se encontró que éstos presentan importante efecto, aunque el ácido 23-hidroxitorméntico presenta un efecto mayor (Choi et al., 2003). Recientemente se ha reportado que *R. coriifolius* Focke biosintetiza metabolitos secundarios del tipo flavan-3-oles [(+)-catequina y (-)-epicatequina] con importante actividad antiprotozoaria, específicamente contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Tabla 1). En esta investigación también se reporta la actividad del nigaichigósido F1, ácido elágico y ácido gálico aislado del extracto CH₂Cl₂:MeOH 1:1 de las partes aéreas de *R. coriifolius* (Alanis et al., 2003). El mismo extracto presentó efecto antiinflamatorio (Meckes et al., 2004). Además, el extracto MeOH de *R. coriifolius*, presenta actividad antiprotozoaria *in vivo*, usando un modelo de infección con *Giardia lamblia*. En el estudio se determinó que la dosis efectiva cincuenta (DE₅₀) para el extracto fue de 0.506

mg/kg, los fármacos utilizados como referencia fueron metronidazol ($DE_{50} = 0.194$ mg/mL) y emetina ($DE_{50} = 0.167$ mg/mL). Estos resultados demostraron que el extracto presentó una actividad moderada y el compuesto responsable del efecto fue la (-)-epicatequina cuya DE_{50} fue de 0.072 μ mol/kg (Barbosa et al., 2006, 2007). Por otro lado, se ha descrito el efecto antibacteriano de otras especies de *Rubus*: *R. chamaemorus*, *R. idaeus*, *R. ulmifolius*; para la especie *R. ulmifolius* se reporta que la actividad antibacteriana se debe a los fenoles y taninos; sin embargo, para el resto de especies no se reportan los compuestos responsables de la actividad, sólo el efecto de los extractos (Panizzi et al., 2002; Rauha et al., 2000; Thiem y Goslinska, 2004; Patel et al., 2004).

Tabla 1. Actividad antiprotozoaria del extracto y de compuestos puros obtenidos del extracto CH_2Cl_2 :MeOH de *R. coriifolius* (Alanis et al., 2003).

Muestras	IC_{50} (μ g/mL)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
Ext. CH_2Cl_2	11.6	55.6
Catequina	65.5	34.0
Epicatequina	1.9	1.6
nigaichigosido	111.9	123.6
hiperina	143.6	49.2
Ácido gálico	220.1	70.3
Ácido elágico	56.5	24.9
Metronidazol (control +)	0.04	0.21

Las actividades biológicas descritas para los flavan-3-oles (catequina y epicatequina) son: efecto antioxidante, presentando protección *in vitro* en células normales contra el estrés oxidativo (Yau et al., 2002; Yilmaz y Toledo, 2004; Geetha et al., 2004), efecto protector contra genotoxicidad (Llopiz et al., 2004) y actividad anti-*Trypanozoma cruzi* (Paveto et al., 2004). Respecto al nigaichigosido F1 (aislado de *R. coriifolius*), aislado previamente de *R. coreanus* (Choi et al., 2003), éste es el responsable del efecto antiinflamatorio y

analgésico, siendo mas activa su aglicona, el ácido 23-hidroxitorméntico. Además, se reporta la presencia de glicósidos de camferol y quercetina en *R. ideaus* que son los responsables del efecto antiinflamatorio (Gudej, 2003). Recientemente se realizó el estudio químico y biológico del material silvestre de *R. liebmannii*, en donde se encontró que (-)-epicatequina presenta importante actividad contra *G. lamblia* y *E. hystolitica*, (+)-catequina y β -sitosterol presenta moderada actividad contra estos parásitos; además aislaron ácido 3,4-dihidroxibenzoico, escualeno y nigaichigosido F1, los cuales presentaron poca actividad contra los dos parásitos (Romero, 2008). El extracto EtOH de *R. liebmannii* micropropagado presenta actividad contra *S. aureus* (CMI= 1 mg/mL), contra *Trichophyton mentagrophites* y *T. tubrum* (CMI=2 mg/mL), contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CMI= 100 μ g/mL), y contra *G. lamblia* (CI₅₀ = 11.75 μ g/mL). Además, este extracto resulto con nulo efecto espasmolítico al ser evaluado sobre ileon de cobayo (CI₅₀ >250 μ g/mL) y con una DL₅₀ >5 g/kg sobre dos especies de roedores. Al realizar la toxicidad subaguda (28 días de administración) se encontró que el extracto no induce alteración en la cuenta blanca, ni en la cuenta roja; además, no encontraron alteración en función renal, hepática ni en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Cornejo, 2008).

De *R. ideaus*, Morimoto y colaboradores (2005) aislaron la 4-(4-hidroxifenil)-butan-2-ona (RK), compuesto aromático mayoritario que presenta una estructura muy similar a la capsaicina y sinefrina, los cuales se sabe tienen una actividad antiobesidad, ya que alteran el metabolismo de los lípidos. Los mismos autores determinaron si el compuesto RK, ayuda a prevenir la obesidad activando el metabolismo; este estudio se realizó en ratones con una

dieta alta en calorías incluyendo 0.5, 1 y 2 % de RK durante 10 semanas, al final del estudio, demostraron que el RK disminuye el tejido adiposo en las vísceras de los animales tratados (Morimoto et al., 2005). Del extracto acuoso de las hojas de *R. occidentales* y de *R. suavissimus* se determinó la capacidad antiangiogénica, encontrándose que el responsable del efecto es el ácido gálico (Liu et al., 2005, 2006). La evaluación gastroprotectora y antirreumática del nigaichigoisido F1 y al ácido 23-hidroxitorméntico aislados de los frutos de *R. coreanus*, demostró que ambos compuestos presentaron dicha actividad (antirreumática y gastroprotectora), siendo el más activo el ácido 23-hidroxitorméntico (Nam et al., 2006). También se ha evaluado la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico (EH), algunas fracciones (hexano, diclorometano, acetato de etilo, y butanol) y del ácido 28-metoxitorméntico de las partes aéreas de *R. rosaefolius*, encontrándose que tanto el EH y el ácido 28-metoxitorméntico presentaron una potente actividad analgésica; ambos tuvieron un efecto más potente que la aspirina y que el paracetamol, antiinflamatorios usados como referencia (Kanegusuku et al., 2007). Otro estudio sobre evaluación de la actividad antiviral del extracto MeOH de las hojas de *R. imperialis*, encontró que éste es activo contra los virus Herpes simple tipo I (HSV-1), KOS y 29-R/acyclovir resistente con una DE_{50} entre 60 a 170 $\mu\text{g/ml}$ (Müller et al., 2007). Una evaluación más reciente sobre la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *R. idaeus*, demostró que éste fue activo. El contenido de compuestos fenólicos en las hojas es muy variado y puede oscilar entre 4.8 a 12.0 mg de ácido gálico por gramo del extracto de la planta. También se identificó en el extracto quercetina-3-O-glucósido y rutina (Venskutonis et al., 2007).

Dada la importante actividad biológica (antibacteriana, antiinflamatoria y antiprotozoaria) para especies del genero *Rubus*, se decidió realizar la investigación química, farmacológica *in vitro* y toxicológica *in vivo* del extracto etanólico de los callos obtenidos por un proceso biotecnológico con la finalidad de explorar el contenido metabólico, su potencial químico y farmacológico para contribuir al estudio de una especie endémica del país.

IMPORTANCIA DE LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales son una fuente importante de principios activos para la industria farmacéutica, ya que aproximadamente el 40% de ellas las utilizan como materia prima o bien como derivados semisintéticos en la producción de fármacos, por eso juegan un papel muy importante en el área de salud a nivel mundial. Por otro lado, numerosas especies vegetales se han utilizado en forma natural (droga cruda) o en diversas preparaciones (cataplasma, tintura, preparados rústicos, te, infusión, polvo, etc.) para tratar o prevenir padecimientos; este uso es ancestral y con mayor relevancia en países en vías de desarrollo donde la importación de medicamentos es elevada debido al escaso desarrollo de éstos (Nalawade y Tsay, 2004; Balunas y Kinghorn, 2005).

De las plantas medicinales se han aislado diversos principios activos como la cocaína, codeína, digitoxina, quinina, morfina, pilocarpina, por tan solo mencionar algunos ejemplos, de los cuales algunos están en uso actualmente o bien sirvieron como moléculas prototipo para la obtención de derivados (Balunas y Kinghorn, 2005; Butler, 2004). En este sentido podemos mencionar, que durante el periodo del 2000 al 2005, cerca de 20 nuevos principios activos de origen natural fueron lanzados al mercado (Chin et al., 2006) y durante 1981-2002, aproximadamente el 28% de los principios activos lanzados fueron de origen natural entre ellos destacan los anticancerígenos y antihipertensivos. Ejemplos recientes de derivados de principios activos lanzados al mercado son arteether (antimalárico), galantamina (anti-Alzheimer), nitisinona (inhibe la actividad de la enzima 4-hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa que previene la

acumulación de productos tóxicos en hígado y riñón), tiotropium (anticolinérgico y broncodilatador).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de plantas medicinales y en la actualidad el interés por el uso e investigación de este recurso se está incrementando. Nalawade y Tsay (2004) describen que las plantas medicinales juegan un papel importante en la economía mundial y en la salud debido a que el 85% de las diversas medicinas tradicionales utilizan plantas y extractos de las mismas.

Una limitante sobre el uso de plantas medicinales como fuente de principios activos o bien como materia prima para la industria farmacéutica, es la disponibilidad de este recurso; ya que muchas especies vegetales crecen solo en cierta temporada y se localizan en zonas geográficas específicas, como en el caso de plantas endémicas; por lo que no se pueden adquirir en cualquier época del año y en cantidad suficiente. Otros factores que limitan la disponibilidad de este recurso es el tiempo de crecimiento, la deforestación que provoca la pérdida de un gran número de especies, el crecimiento de la mancha urbana y la tasa anual de extinción de especies, aunados a la pérdida de conocimiento sobre el valor tradicional y potencial de las plantas medicinales.

La gran variedad de zonas climáticas existentes en el mundo, da lugar a una diversidad de especies medicinales, algunas de las cuales ya han sido objeto de investigación química y/o farmacológica; sin embargo, muchas de ellas son

especies desconocidas o parcialmente investigadas por lo que no se conoce su potencial farmacológico y/o biológico.

Actualmente, la mayoría de las especies vegetales de interés farmacéutico son producto de cultivos agrícolas en donde los métodos de producción y estandarización de los mismos es pobre, susceptible de infección por bacterias, hongos e insectos que pueden alterar el contenido de los compuestos de interés, por lo que es difícil asegurar el control de calidad. Pero escasas especies son colectadas de manera silvestre en donde el control de calidad es aún más pobre (Rout et al., 2000).

Una herramienta eficiente que existe hoy en día para asegurar la producción y/o demanda de ciertas especies vegetales es la producción por métodos *in vitro* (Nalawade y Tsay, 2004). La propagación de plantas por este método (*in vitro*) tiene la ventaja de ser uniforme, estéril y donde el contenido de principios activos puede ser controlado. Además, los compuestos de interés en estos cultivos son más fáciles de purificar debido a la ausencia de pigmentos por lo que los costos de producción y de procesamiento se reducen.

El cultivo de tejido es empleado principalmente para propagación de biomasa, conservación de germoplasma, producción de principios activos y manipulación genética.

Los modelos experimentales para la propagación de plantas medicinales a través del cultivo de los tejidos se pueden clasificar en tres categorías. El modelo más común es el de aislar meristemas (tejidos) organizados como brotes axilares e inducir el crecimiento de plantas completas, el cual es conocido comúnmente como micropropagación. El segundo sistema consiste

en inducir brotes adventicios a partir de hojas, raíces ó tallo y puede hacerse también por inducción a partir de los callos derivados de estas partes. El tercer sistema de propagación involucra la inducción de embriogénesis somática en cultivos de células y callos. Este último sistema teóricamente es más eficiente ya que un gran número de embriones somáticos pueden ser obtenidos una vez que todo el proceso está estandarizado.

La biotecnología involucra modernos y actuales cultivos de tejidos, además la biología celular y la biología molecular están ofreciendo la oportunidad de desarrollar nuevos germoplasmas que pueden adaptarse a las demandas cambiantes de la industria farmacéutica (Rout et al., 2000).

En el mercado existen mas de 50 formulaciones, los cuales se pueden utilizar para realizar el cultivo *in vitro*, los cuales contienen macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S), micronutrientes (Mn, Zn, B, Cu, Cl, Mo y Ni), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y miositol), reguladores de crecimiento vegetal (auxina y citocinina). En este sentido la relación de auxina-citocinina determina el desarrollo de células no diferenciadas o raíz. Las giberelinas son otro tipo de reguladores que estimulan el crecimiento de órganos ya diferenciados (Rout et al., 2000). Además, la luz, la temperatura, humedad son parámetros de gran importancia para los cultivos *in vitro*.

El callo (Figura 3) es un conjunto desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido, la inducción del crecimiento de los callos y subsecuente diferenciación y organogénesis se logra por la aplicación de diferentes reguladores de crecimiento y el control de las condiciones en el medio de cultivo. La división celular, el crecimiento celular y la diferenciación de los

tejidos son estimulados con sustancias de crecimiento endógenos o por la adición de reguladores de crecimiento exógenos presentes en el medio nutritivo. En las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizadas, dando origen a una masa amorfa de tejidos. Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos dependiendo fundamentalmente del balance auxina-citocinina en el medio de cultivo.

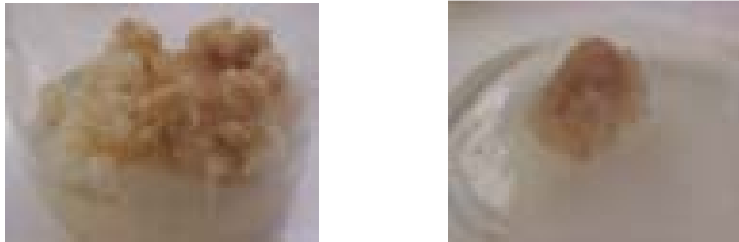


Figura 3. Callos de *Rubus liebmannii*, obtenidos por micropropagación.

Por ejemplo, en el caso de *Pinellia ternata* se reporta la generación de brotes a partir de explantes o bien por cultivo de callos y en el caso de *Plumbago rosea* se indujo la regeneración de brotes mediante el uso de concentraciones apropiadas de auxinas y citocininas; y en *Dioscorea alata* se indujo la producción de brotes, raíces y microtubérculos por el uso de medio, tipo de explante empleado y fotoperiodo (Rout et al., 2000).

Algunos ejemplos de principios activos de interés farmacéutico y alimentario que se obtienen por proceso biotecnológico son la shikonina (colorante y antibacteriano) que se obtienen por cultivo de las células de *Lithospermum*, los

alcaloides (vincristina y vinblastina) de *Catharanthus roseus*, alcaloides tropánicos de *Duboisia*, entre otros (Rout et al., 2000)

Las plantas biosintetizan ciertos metabolitos secundarios con estructuras complejas que son difíciles de sintetizar en el laboratorio; por lo que muchos de ellos se pueden obtener por medio de cultivo *in vitro*, un ejemplo importante lo constituye el taxol (anticancerígeno) que se obtiene de la corteza *Taxus baccata* y *T. brevifolia*. A través de los diferentes sistemas que existen para el cultivo celular *in vitro* se pueden crear líneas celulares capaces de producir altos rendimientos de metabolitos secundarios en células de cultivos en suspensión.

El cultivo de células *in vitro* de plantas medicinales nos permite desarrollar métodos específicos para inducir la producción de metabolitos secundarios activos; por lo que constituyen una herramienta de gran importancia. Además, este sistema ayuda a la preservación de especies vegetales en peligro de extinción o bien a evitar la deforestación (Nalawade y Tsay, 2004).

El caso de *Rubus liebmannii*, recientemente ha despertado el interés debido a que esta planta se distribuye en diferentes estados de la República Mexicana, es empleada en la medicina tradicional de México y biosintetiza compuestos (polifenoles y triterpenos) con importante efecto biológico; además cabe aclarar que esta especie vegetal está muy relacionada con *R. coriifolius*.

El presente trabajo es parte de un proyecto estratégico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) titulado “Evaluación Farmacológica-toxicológica y química de la especie *Rubus liebmannii* micropropagada y cultivos de callos” (Clave 2006/1B)/I/006), donde a la par de realizar la investigación química,

biológica y toxicológica de los callos se realizó la investigación química-biológica del material micropropagado y del vegetal colectado en su hábitat natural (silvestre) (Romero, 2008; Cornejo, 2008). Este proyecto se desarrolla entre la Unidad Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales (UIMFPN), Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) y Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del IMSS.

En este trabajo se describen los resultados derivados del estudio fitoquímico de los callos de *R. liebmannii*.

OBJETIVO. Realizar el estudio químico-biológico y toxicológico de los callos derivados de hoja y pecíolo de *Rubus liebmannii*.

METODOLOGÍA.

I. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Los callos se obtuvieron a partir de las hojas y pecíolos de la especie *Rubus liebmannii*; especie colectada en Ozumba, Estado de México, en dos condiciones nutricionales diferentes, estas condiciones nutricionales se describen en la [Tabla 2](#) (Nicasio et al., 2007)

Tabla 2. Medio de cultivo (Murashige y Skoog) empleado para la micropropagación de los callos de *R. liebmannii*.

Solución inorgánica (Medio I y II)

Compuesto	Fórmula	Conc. mg/mL	Soluciones 10x
			g/L
1.-cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4.4
2.- nitrato de potasio	KNO_3	1900	19
3.- nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650	16.5
4.-fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	170	1.7
5.-sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.86	0.28
6.- EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25	0.373

7.-sulfato manganoso monohidratado	MnSO ₄ H ₂ O	16.88	0.169
8.- yoduro de potasio	KI	0.83	0.0083
9.-sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	0.086
10.- ácido bórico	H ₃ BO ₄	6.2	0.062
11.-sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ 7H ₂ O	370	3.7
12.-*cloruro de cobalto hexahidratado	*CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	25 mL
13.-*sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	25 mL
14.-molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O	0.25	250 mL

Solución orgánica (Medio I y II)

Compuesto	Conc. mg/mL	Soluciones 100x (g/L)
Glicina	2	0.2
Mio-inositol	100	10
Tiamina HCl	0.1	0.01
Piridoxina HCl	0.5	0.05
Ácido Nicotínico	0.5	0.05

Hormonas

Hormona	Medio I mg/mL	Medio II mg/mL
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	1	1
Ácido naftalenacético (ANA)	1	0
Ácido indolacético (AIA)	0	1
Ácido indolbutírico (AIB)	1	1
Cinetina (CN)	1	1
Ácido Giberélico (GA3)	1	1
Benzil – aminopurina (BAP)	1	1

Una vez terminado el periodo de crecimiento, el material biológico se retiró del medio de cultivo, se secó a temperatura ambiente y a la sombra, obteniéndose 23.0 g de callo de hoja y 25.7 g de callo de pecíolo del **Medio I** y 45.6 g de callo de hoja y 60.8 g de callo de pecíolo del **Medio II**. Posteriormente, se preparó el extracto etanólico de la muestra de hoja y de la de pecíolo del **Medio I y Medio II** respectivamente, los extractos se prepararon alternadamente cambiando el

disolvente cada 7 días repitiendo el procedimiento hasta cinco veces. El disolvente se eliminó a presión reducida en un rotaevaporador (Büchi 461 Water Bath) y un recirculador (ECO 20, ESEVE) acoplado a una bomba de vacío (Büchi Vac V-513). Una vez obtenido el extracto seco se procedió a calcular el rendimiento con base en la cantidad total de material vegetal seco utilizado inicialmente en cada caso. Después los extractos fueron comparados en una cromatografía en capa fina (ccf) para observar si las diferentes condiciones nutricionales provocarían cambios importantes en la producción de metabolitos. Se observó la cromatoplaca al UV, para posteriormente revelarla con ácido sulfúrico al 10%. Además, los extractos fueron sometidos a un análisis en HPLC con una columna C18 de fase reversa (Waters Sphrisorb[®] S10 ODS2, 10 x 250 mm, Semi-Prep) con un flujo de 1 mL/min, utilizando como fase móvil Acetonitrilo:MeOH:H₂O en proporción 60:20:20 respectivamente, con una duración de corrida de 60 min, para los cuatro extractos. El perfil cromatográfico tanto en HPLC como en cromatografía en capa fina (ccf) fue similar para todos los extractos, por lo que se reunieron y se llevaron a sequedad completa.

II. FRACCIONAMIENTO

Del extracto libre de disolvente orgánico, 25.0 g (de la mezcla de los extractos, A2B) fueron sometidos a [fraccionamiento químico](#) en cromatografía en columna de fase normal empleando 250.0 g de sílica gel (malla 70-230ast, Merck) utilizando como fase móvil mezclas de disolventes de grado creciente de polaridad iniciando con hexano 100% (hex), mezclas de hex:CHCl₃, CHCl₃ 100%, mezclas de CHCl₃:EtOH y EtOH 100%, se colectaron fracciones de 550 mL cada una. Mediante este proceso se obtuvieron 63 fracciones y se

reunieron en 13 grupos (F1 a F13) de acuerdo a su perfil cromatográfico observado en ccf, ver Tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento primario del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

hex	CHCl ₃	EtOH	Fracciones		Clave
			Colectadas	Reunidas	
75	25		2-8	1-4	F-1
75	25			5-6	F-2
60	40		9-12	7-13	F-3
50	50		13-19	14-18	F-4
25	75		20-29	19-28	F-5
	100		30-37	29-30	F-6
	100			31-37	F-7
	80	20	38-46	38-40	F-8
	80	20		41-42	F-9
	80	20		43-46	F-10
	60	40	47-53	47-53	F-11
	40	60	54-58	54-58	F-12
		100	59-63	59-63	F-13

Las fracciones primarias fueron sometidas a evaluación biológica (antibacteriana, antifúngica y espasmolítica). La fracción activa F-5 fue objeto de un [fraccionamiento](#) secundario, empleando 2.0 g de F-5 y 40.0 g de sílica gel (malla 70-230ast, Merck), en una columna de fase normal, eluyendo con mezcla de disolventes de grado de polaridad creciente iniciando con mezclas de hex:CHCl₃, CHCl₃ 100%, mezclas de CHCl₃:EtOH y EtOH 100%, las fracciones recolectadas fueron cada una de 150 mL. Se obtuvieron 66 fracciones secundarias y se reunieron según su perfil cromatográfico en ccf en 11 grupos (F5-1 a F5-11) ver Tabla 4.

Tabla 4. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F5.

hex	CHCl ₃	EtOH	Fracciones		Clave
			Colectadas	Reunidas	
80	20		1-11	1-5	F5-1
60	40		12-15	6-13	F5-2
60	40			14-15	F5-3
30	70		16-26	16-27	F5-4
	100		27-40	28-40	F5-5
	90	10	41-59	41-45	F5-6
	90	10		46-48	F5-7
	90	10		49-50	F5-8
	90	10		51-59	F5-9
	70	30	60-64	60-63	F5-10
	10	90	65-66	64-66	F5-11

La fracción secundaria F5-6 se sometió a evaluación espasmolítica. Con el fin de purificar ésta fracción activa, se realizó un último [fraccionamiento](#), en este caso se utilizaron 1.2 g de la F5-6 en 39.0 g de sílica gel (Merck), en una columna de fase normal eluyendo con mezclas de disolventes de grado de polaridad creciente comenzando con mezcla de hex:Acetato de Etilo (AcOEt), AcOEt 100%, mezclas de AcOEt:EtOH y EtOH 100%, las fracciones recolectadas fueron cada una de 150 mL c/u. Obteniéndose 36 fracciones terciarias, las cuales fueron reunidas según su perfil cromatográfico en 14 grupos (F5-6-1 a F5-6-14) ver Tabla 5

Tabla 5. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F5-6

hex	CHCl ₃	EtOH	Fracciones	Clave
-----	-------------------	------	------------	-------

			Colectadas	Reunidas	
60	40		1,-11	1	F5-6-1
60	40			2	F5-6-2
60	40			(3-4)	F5-6-3-4
60	40			5	F5-6-5
60	40			6	F5-6-6
60	40			(7-9)	F5-6-7
60	40			(10-12)	F5-6-8
40	60		12,-20	13	F5-6-9
40	60			(14-15)	F5-6-10
20	80		22,-26	(16-24)	F5-6-11
	100		27,-32	(25-30)	F5-6-12
	100			(31-33)	F5-6-13
	50	50	33,-36	(34-36)	F5-6-14

En todas las fracciones recolectadas se eliminó el disolvente bajo presión, las fracciones finales se secaron y se calculó su rendimiento respecto a la cantidad de muestra seca utilizada para cada columna.

III. PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS.

Debido a que con los fraccionamientos (primario, secundario y terciario) no se logró una separación de los compuestos de interés, se realizó cromatografía en placas preparativas de sílice gel (20x20 cm de vidrio recubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄; Merck) de las fracciones terciarias F5-6-5 y F5-6-6 (fracciones que contenían los compuestos mayoritarios) utilizando como sistema de elución hex-AcOEt en proporción 1:9 respectivamente con 5 gotas de MeOH por cada 5 mL de sistema; una vez eluidas las placas, éstas se observaron al UV y se revelaron con reactivo de Liebermann-Burchard (1 mL de anhídrido acético, 1 mL de ácido sulfúrico en 10 mL de Etanol) (Wagner et al., 1984). Las bandas observadas (4) se rasparon y se les agregó una mezcla de hex-AcOEt suficiente para extraer los compuestos con agitación constante durante 15-20 min en una parrilla de agitación magnética (Cimarec 2). Una vez transcurrido el

tiempo de agitación, se filtró cada muestra y se eliminó el disolvente a presión reducida, posteriormente se calculó el peso de cada muestra y se realizó una ccf de comparación utilizando como sistema AcOEt:Tol (9:1), con las muestras obtenidas con las referencias (F5-6-5 y F5-6-6); después de eluir la placa, se observó al UV y se reveló con ácido sulfúrico al 10 % y se observó que las muestras resultantes aun presentaban impurezas. La banda A se sometió nuevamente en una placa preparativa, utilizando el mismo sistema que para las muestras anteriores y se llevó a cabo el mismo proceso que en las muestras anteriores. Una vez obtenidas las extracciones de la bandas, libres de disolvente y pesadas, se compararon en una ccf, con la referencia F5-6-5, utilizando como sistema AcOEt:Tol (9:1) y nuevamente se observó que las muestras aun presentaban impurezas.

Con la finalidad de purificar el compuesto se realizó nuevamente placa preparativa empleando como sistema, AcOEt:Tol (9:1); mediante este proceso de obtuvieron 8 mg de un compuesto semipuro, el cual se envió para su análisis de RMN-¹H para su identificación.

IV. PROCESO DE PARTICIÓN

Con la finalidad de eliminar azúcares presentes en el extracto, se tomó 1.0 g del extracto original y se hizo una partición utilizando agua y acetato de etilo, repitiendo el proceso tres veces con proporciones iguales de AcOEt, y se reunieron las fracciones orgánicas (FO1); la fase acuosa se llevó a pH 2 con ácido clorhídrico al 10%, se lavó con tres porciones iguales de AcOEt, y se unieron las fases orgánicas (FO2). Se eliminó el disolvente de las dos fases

orgánicas a presión reducida, y se compararon en una ccf, y dada la similitud en su perfil cromatográfico se unieron las dos fases (FO). Posteriormente se comparo FO en ccf con la F5. El perfil cromatográfico en ccf para ambas muestras resulto muy similar.

V. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Evaluación Antibacteriana. Las cepas de microorganismos empleados fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 06301); *Escherichia coli* (ATCC 8937); *Salmonella typhi* (ATCC 06539) y *Candida albicans* (ATCC 1023). El ensayo se realizó siguiendo el procedimiento previamente descrito por Rojas y col. (2001).

Todas las bacterias fueron mantenidas en Agar Tripticasa Soya (ATS; Merck) a 37°C. Se agregó sangre de cordero desfibrinado al 5% al medio para *S. pyogenes*. La levadura fue mantenida en Agar dextrosa Sabouraud 4% (ADS; Merck).

Evaluación Antifúngica. Para este estudio se prepararon soluciones stock del extracto y del control, las cuales se prepararon en DMSO (Merck), a concentraciones de 60 y 5 mg/mL, respectivamente, resultando una solución homogénea de cada una. Las disoluciones fueron preparadas usando agua estéril bidestilada. El control positivo se preparó con ketonazol (Sigma) y nistatina (Merck). La concentración final en DMSO para la prueba fue menor de 2% (v/v). Los microorganismos usados fueron *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), *T. rubrum* (ATCC 28188) y fueron mantenidos en Agar Dextrosa Papa (ADP; Merck) a 27°C. El ensayo antifúngico fue hecho por el

método de disolución de agar, usando cajas Petri de 100 x 15 mm (Falcon). Las soluciones stock del extracto y del control fueron diluidas por duplicado en un rango de concentraciones de 1-8 mg/mL, respectivamente. Un inóculo final de 10^6 esporas/mL de los hongos filamentosos fueron colocados sobre la superficie del agar solidificado, con una micropipeta ajustada a 10 μ L. Los experimentos fueron hechos por triplicado para cada caso y las cajas Petri fueron incubadas a 29 °C. El crecimiento de los microorganismos fue observado, a las 24, 48 y 72 h, ya que el periodo de incubación requerido para los dermatofitos es de 72 h. La CMI fue definida como la concentración mínima del extracto necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Evaluación del Efecto Espasmolítico *in vitro*. Para este estudio se utilizaron cobayos machos de la cepa Hartley de 300 a 400 g de peso. Para el manejo de los animales de laboratorio se contemplaron las normas establecidas en NOM-062-ZOO-1999. Los animales se mantuvieron en ayuno de 6 horas con libre acceso de agua y fueron sacrificados por golpe en la nuca y dislocación cervical. El tejido intestinal se extirpó y de la porción íleo-cecal se eliminaron los primeros 10 cm, el resto se mantuvo en medio Tyroide (I) a 37 °C y burbujeo constante de 95% O₂ y 5% CO₂.

Una vez lavado el lumen del intestino para extraer restos de materia fecal, se cortaron segmentos de 1.5-2.0 cm. Ambos extremos del segmento se ataron con hilo de seda 5-00 suspendiéndolos verticalmente en un baño para órganos aislados que contenía 10 mL del medio Tyrode (I) a 37 °C, pH de 7.4 y burbujeo continuo con 95% O₂ y 5% CO₂. El medio Tyrode (I), presentó la siguiente composición (mM): NaCl 127, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8; NaH₂PO₄ 0.36; MgCl₂ 0.88; NaHCO₃ 12.0; Glucosa 5.5; esta solución se preparó con agua bidestilada. Un

extremo del tejido se conectó a un transductor de fuerza Grass FTO3 acoplado al polígrafo Grass (previamente calibrado a una sensibilidad de 2 cm. para la tensión de 1.0 g) y el otro extremo se fijó a la cámara; de manera paralela se trataron otros 8 segmentos. Las preparaciones se dejaron estabilizar durante 60-90 min cambiando el medio cada 15-20 min y tensando los tejidos a 1 g de fuerza (2 cm; escala de la hoja del polígrafo). Una vez estabilizados los tejidos se indujo la respuesta contráctil sustituyendo el medio del baño por un medio despolarizante Tyrode (II) cuya composición es similar a la Tyrode (I) pero cambiando la proporción Na^+/K^+ para tener una solución isosmótica alta en K^+ (60 mM); esto se logra sustituyendo el NaCl por concentraciones equimolares de KCl para conservar la isotonicidad. Después de 15 min de registrar la respuesta contráctil se lavó y se repitió el proceso 2 ó 3 veces, hasta obtener registros similares manteniéndolos durante 30-45 min para registrar la respuesta contráctil máxima (100%). Las muestras problema se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO; Merck), a una concentración de 10 mg/mL y se adicionaron en alícuotas de 1-8 μL cada 3 min hasta inhibir la respuesta contráctil tónica inducida. Posteriormente se calculó la concentración del extracto que inhibió el 50% de la respuesta máxima del tejido (100% de actividad).

VI. TOXICIDAD.

Toxicidad aguda. El estudio de toxicidad aguda del extracto EtOH se determinó en ratas macho (♂) y hembras (♀) Sprague Dawley (SD) de 8 semanas de edad y 200-250 g de peso; también se determinó en ratones hembra (♀) Balb C de 20-25 g de peso, siguiendo la metodología descrita por Lorke (1983). Los animales, fueron pesados, marcados y se formaron

aleatoriamente cinco grupos de cinco animales cada uno. Los grupos se colocaron en cajas independientes y se mantuvieron en el Bioterio del CMN Siglo XXI, a 27°C con un ciclo de 12 h de luz y oscuridad, teniendo libre acceso de alimento y agua. El manejo de los animales de experimentación fue apegado a los estatutos del Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) revisada en 2001. Las dosis del extracto para ambos estudios fueron las siguientes: 1 (grupo 2), 1.6 (grupo 3), 2.9 (grupo 4) y 5 (grupo 5) g/kg; en el caso del control (grupo 1) se utilizó únicamente el vehículo DMSO:H₂O en proporción 3:7 (Agua inyectable, Irriguadal y DMSO, Reasol). Para el manejo de los animales de laboratorio se contempló la norma oficial establecida en el diario oficial de la federación (NOM-062-ZOO-1999). Los extractos se prepararon en el vehículo a las dosis anteriormente señaladas, posteriormente fueron administrados a los animales por vía oral, en una sola dosis, usando una cánula de acero del #14 para las ratas y una #8 para los ratones. Los animales tratados se mantuvieron en observación durante 15 días. La observación visual incluía cambios en la piel, pelo, ojos, mucosas, modificación en conducta, movimientos hacia atrás, excitación y desequilibrio en el sistema sicomotor. Al finalizar el periodo de observación se pesaron los animales y se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se realizó la extracción y observación macroscópica de los siguientes órganos: hígado, riñones, bazo, corazón, estómago e intestino, para observar algún daño debido a la administración del extracto, comparándose con el grupo control.

Toxicidad sub-aguda. El estudio de toxicidad sub-aguda del extracto EtOH se determinó en ratas ♂ SD de ocho semanas de edad con un peso de 200-250 g.

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente en cinco grupos de cinco animales cada uno, un grupo blanco, un grupo control de vehículo y tres grupos tratados con extracto. Los animales se pesaron, marcaron y se colocaron por grupo en cajas independientes. Se albergaron en el Bioterio del CMN Siglo XXI, a una temperatura de 27°C, un ciclo de 12 h de luz y oscuridad con alimento y agua libre. Para el manejo de los animales de laboratorio se contempló la norma establecida en el diario oficial de la federación NOM-062-ZOO-1999 y revisada en el 2001. Las dosis utilizadas para este estudio fueron de 5, 50 y 500 mg/kg., en el caso del grupo blanco sólo se le administró agua inyectable (Irrigadual) y para el caso del grupo control de vehículo, se le administró solamente el vehículo DMSO:H₂O en proporción 2:8 (Reasol). El extracto se disolvió en DMSO y una vez disuelto se ajustaba la concentración correspondiente con agua inyectable y se administró por vía oral usando una cánula de acero del #14. La administración se realizaba por cinco días consecutivos, seguidos de dos días sin administración, repitiendo el mismo procedimiento hasta completar 21 días de administración. Los animales se pesaron y marcaron cada siete días; durante todo el estudio se mantuvieron las condiciones de temperatura, luz, alimento y agua constantes. Al finalizar el estudio los animales se pesaron y se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 56 mg/kg, para extraerles la sangre. Se colocó 1 mL de sangre en un tubo con heparina para el estudio de biometría hemática y de 8-10 mL de sangre en tubo sin anticoagulante para el estudio de química sanguínea. Una vez sacrificado el animal se le extrajeron los siguientes órganos: hígado, corazón, riñones, intestino, estómago, bazo, piel y hueso. Cada órgano se pesó y posteriormente se mantuvieron en EtOH grado histológico (J.T. Baker) para

realizar el análisis histopatológico. Los estudios de biometría hemática se determinaron en forma semi-automatizada empleando un equipo Coulter T 890 y los análisis de química sanguínea fueron determinados en un autoanalizador de química sanguínea (Selectra II, Italab) empleando reactivos marca Randox.

Estudio de histopatología: Los órganos extraídos de los animales fueron pesados y lavados en solución isotónica, posteriormente fueron sumergidos en etanol anhidro (J.T.Baker) durante 48 h para su fijación. Transcurrido el tiempo, los tejidos fueron retirados del etanol y colocados en un procesador de tejidos (Leica TP1020 automatizado) para hacerlos pasar por xileno por una hora en dos ocasiones y finalmente se incluyeron en parafina histológica. Posteriormente, este tejido fue colocado en cubos de parafina para obtener cortes de 8 μm realizados en un micrótopo (Letz Wetzlar). Cada corte es teñido con la técnica de hematoxilina-eosina. Los cortes de cada órgano se analizaron en el microscopio (Axolab, Carl Zeiss acoplado a una cámara Sony CCD-IRIS) con la intención de buscar alteraciones histopatológicas respecto al grupo control.

Análisis Estadístico: El análisis de los datos de biometría hemática y química sanguínea se realizó mediante el programa Sigma Stat 3.5 y se reportan como media \pm error estándar de la media (SEM) y la significancia estadística se determinó por ANOVA. Los datos de toxicidad aguda se analizaron por la prueba de T de student's con una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Este trabajo constituye parte de un proyecto estratégico interinstitucional que se desarrolla en el Instituto Mexicano del Seguro Social y tiene como objetivo realizar la “Evaluación farmacológica-toxicológica y química de la especie *Rubus liebmannii* micropropagada y cultivos de callos”, con la finalidad de explorar el tipo de metabolitos secundarios que biosintetizan los callos y en material obtenido por micropropagación, así como el efecto biológico del extracto etanólico de ambos materiales. Con este trabajo se contribuye a conocer el efecto antibacteriano, espasmolítico y toxicológico de los callos con miras a proponer la especie *R. liebmannii* como materia prima para el desarrollo de un posible fitofármaco. El empleo de material vegetal obtenido por procesos biotecnológicos tiene la ventaja que se puede obtener en cantidad suficiente en poco tiempo a diferencia del material vegetal de origen natural, con buen control de calidad, entre otras ventajas.

El género *Rubus* es de importancia debido a que muchos extractos presentan importante efecto antioxidante, siendo en muchos casos los polifenoles los responsables del efecto biológico. Por otro lado, especies de este género biosintetizan diversos metabolitos secundarios principalmente triterpenos y flavonoides con actividad antiprotozoaria, antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica, entre otras actividades biológicas. Dentro de los triterpenos más activos están el ácido 28-metoxitorméntico aislado de *R. coreanus*, ácido torméntico y ácido 23-hidroxitorméntico aislados de *R. pinfanesis*, *R. coreanus* y *R. cochinchinensis* (Zhou et al., 1992, Lien et al., 1999, Choi et al., 2003) y el nigaichigósido F1 obtenidos del extracto metanólico de *R. rosaefolius*, *R.*

accuminatus, *R. ellipticus*, *R. suavisimus*, *R. multibreatus*, *R. coreanus*, *R. corifolius*, *R. liebmannii* (Zhou et al., 1992; Choi et al., 2003, Alanis et al., 2003, Romero, 2008), los cuales son responsables del efecto antiinflamatorio, analgésico, antirreumático y gastroprotector (Choi et al., 2003, Nam et al., 2006; Kanegusuku et al., 2007). Cabe mencionar que el nigaichigósido F1 aislado de *R. corifolius* y *R. liebmannii* presentó moderada actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia* y *E. hystolitica* (Alanis et al., 2003, Romero, 2008). Recientemente se realizó el estudio químico y biológico del material silvestre de *R. liebmannii*, en donde se encontró que (-)-epicatequina presenta importante actividad contra *G. lamblia* y *E. hystolitica*, (+)-catequina y β -sitosterol presentan moderada actividad contra estos parásitos; además aislaron ácido 3,4-dihidroxibenzoico, escualeno y nigaichigósido F1, los cuales presentaron poca actividad contra los dos parásitos (Romero, 2008). Del material vegetal micropropagado se reporta la presencia de (-)-epicatequina y nigahichigosido F1, los cuales son responsables del efecto contra *G. lamblia* mostrado por el extracto (Cornejo, 2008).

En este trabajo se describe el efecto biológico del extracto etanólico de los callos de *R. liebmannii*. El rendimiento de los cuatro extractos fue alrededor del 28.5 % (Tabla 6) y el perfil cromatográfico en ccf y HPLC fue similar tanto para el extracto obtenido de hojas y de pecíolo, por lo que estos extractos se reunieron. El peso del extracto seco total reunido fue de 114.42 g.

Tabla 6. Rendimiento de extractos etanólicos de callos obtenidos de pecíolo y hojas de *R. liebmannii*.

CLAVE DEL MATERIAL VEGETAL	PESO DE EXTRACTO	RENDIMIENTO (%)
A2H	15.96	25.41

A2P	33.90	31.77
B2H	16.08	22.53
B2P	21.80	34.71

A2H = Callo de hoja en medio I, A2P = Callo de pecíolo en medio I. B2H = Callo de hoja en medio II, B2P = Callo de pecíolo en medio II.

Dada la similitud de los extractos, éstos se reunieron y fueron sometidos a evaluación antibacteriana, antifúngica, antiespasmódica y toxicológica. Los resultados de cada ensayo se describen a continuación.

El extracto EtOH no afectó el crecimiento de ninguna bacteria, ni de la levadura siendo la CMI >8 mg/mL. Respecto al efecto antifúngico, se observó que el extracto inhibe ligeramente el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* y de *T. rubrum*, obteniéndose una CMI de 8 mg/mL. Los resultados de la evaluación del efecto espasmolítico, determinado sobre íleon de cobayo indican que el extracto presenta una actividad marginal (CI₅₀= 94.42 µg/mL) ver (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación de la actividad antibacteriana, antifúngica y espasmolítica en ileon de cobayo del extracto EtOH de *R. liebmannii*.

Muestra	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mg/mL			Actividad espasmolítica CI ₅₀ (µg/mL)
	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	8	9	
A2B	>8	8	8	94.42 ± 14.03

Controles positivos : gentamicina 5 µg/mL (bacterias), nistatina 8 µg/mL (*C. albicans*), ketonazol (Sigma) y nistatina (Merck) 8 µg/mL (hongos). 1 = *S. aureus*, 2 = *S. pyogenes*, 3 = *E. fecalis*, 4 = *E. coli*, 5 = *P. mirabilis*, 6 = *S. typhi*, 7 = *C. albicans*, 8 = *T. mentagrophytes*, 9 = *T. rubrum*

La toxicidad aguda (DL₅₀) se determinó por el método de Lorke (1983), en ratones Balb C y en ratas SD, empleando grupos de 5 animales c/u. La dosis máxima evaluada fue de 5 g/kg de extracto, solubilizada en DMSO:H₂O (3:7), administrándose en una sola dosis por vía oral. En el estudio se incluyó un control de vehículo (DMSO:H₂O 3:7) para evitar resultados falsos positivos. La

DL₅₀ obtenida para ambas especies de roedores fue > 5 g/kg, (ver Tabla 8) y durante el estudio no se observó ningún cambio en el comportamiento, ni alteración macroscópica en la piel, pelo, ojos, mucosas, etc., ni mortalidad.

Tabla 8. DL₅₀ del extracto EtOH de *R. liebmannii* en ratones y ratas.

Toxicidad	DL ₅₀ (g/kg)		
	Ratón Balb-C	Rata Sprague Dawley	
	♂	♂	♀
Aguda	>5	>5	>5
Sug aguda	ND	>0.5	ND

Los animales que sobrevivieron al estudio fueron pesados y sacrificados sin observarse variación significativa en el peso. La DL₅₀ obtenida para el extracto etanólico de *R. liebmannii* permite determinar que no es tóxico.

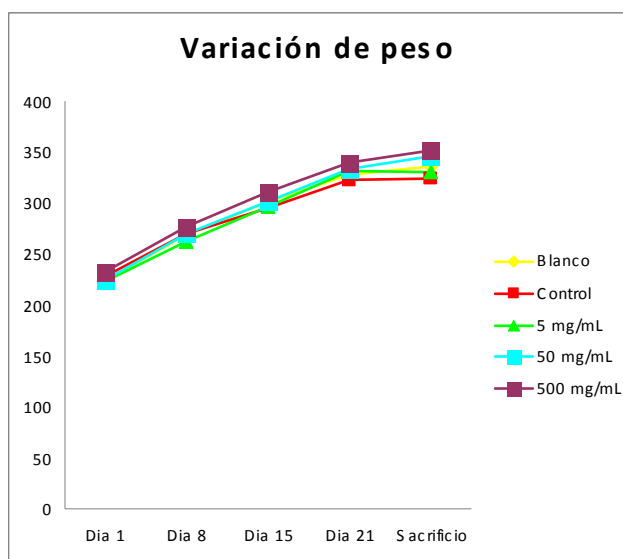
Este método se empleó debido a que ofrece la ventaja que con una cantidad mínima de animales se puede obtener la información deseada, siempre y cuando se escojan las dosis adecuadas de extracto a evaluar; además, es importante mencionar que la determinación de la toxicidad aguda es uno de los primeros pasos en estudios toxicológicos de material vegetal (Lorke, 1983; Deciga-Campos et al., 2007). En el estudio de la toxicidad aguda de ciertas sustancias o extractos de plantas es importante tomar en cuenta la reducción de peso corporal o mortalidad, ya que constituyen indicios de gran relevancia (Thanabhorn et al., 2006).

Respecto al estudio de toxicidad sub-aguda, con duración de 28 días, se determinó únicamente en ratas macho SD. La administración del extracto se realizó por vía oral a dosis de 5, 50 y 500 mg/kg. En este estudio se incluyó un

grupo blanco (H₂O) y un control de vehiculo (DMSO:H₂O 2:8). Durante el tratamiento, los animales fueron pesados cada semana sin observarse cambio significativo respecto al grupo control (Tabla 9). En todos los grupos se observa un incremento normal del peso (Gráfica 1) durante el periodo de tratamiento.

Tabla 9. Evaluación de la toxicidad sub-aguda del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*. Seguimiento del aumento de peso corporal por semana, durante la evaluación.

Grupo	Día 1	Día 8	Día 15	Día 21	Día 28
Blanco	224.80 ± 4.07	269.40 ± 4.75	301.20 ± 4.81	328.00 ± 5.59	335.60 ± 7.47
Control	228.80 ± 2.80	270.40 ± 5.08	295.60 ± 7.97	322.00 ± 9.35	324.40 ± 10.83
5 mg/kg	223.00 ± 5.47	262.20 ± 7.96	296.40 ± 11.9	332.00 ± 9.65	330.80 ± 9.33
50 mg/kg	224.00 ± 5.88	270.80 ± 6.61	302.20 ± 7.02	332.60 ± 10.49	346.40 ± 13.95
500 mg/kg	231.80 ± 4.04	276.20 ± 5.35	310.80 ± 7.10	340.00 ± 8.06	351.20 ± 10.11

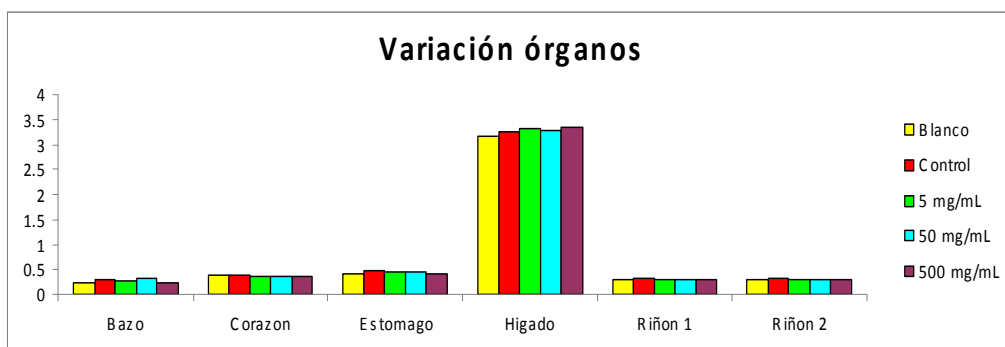


Gráfica 1. Variación de peso semanal de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda, tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

Además, no se observaron cambios en el comportamiento, ni alteración macroscópica en piel, pelo, ojos mucosa etc., de los animales tratados. Al final del experimento, se obtuvieron muestras sanguíneas para el análisis de biometría hemática y química sanguínea y se extrajeron órganos (hígado, riñones y bazo) para estudios histopatológicos, los cuales fueron también pesados. Respecto al peso de los órganos no se observó diferencia significativa de los animales tratados con el extracto, al compararlo con el control de vehículo y blanco (Tabla 10 y Gráfica 2).

Tabla 10. Evaluación de la toxicidad sub-aguda del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.
Peso de órganos (g).

Grupo	Bazo	Corazón	Estómago	Hígado	Riñón 1	Riñón 2
Blanco	0.78 ± 0.06	1.26 ± 0.02	1.38 ± 0.07	10.600 ± 0.46	1.02 ± 0.02	1.020 ± 0.06
Control	1.00 ± 0.07	1.22 ± 0.07	1.50 ± 0.05	10.520 ± 0.41	1.06 ± 0.05	1.020 ± 0.05
5 mg/kg	0.92 ± 0.08	1.16 ± 0.04	1.52 ± 0.07	10.980 ± 0.43	0.98 ± 0.02	0.960 ± 0.02
50 mg/kg	1.14 ± 0.16	1.24 ± 0.09	1.52 ± 0.07	11.360 ± 0.46	1.06 ± 0.05	1.080 ± 0.04
500 mg/kg	0.86 ± 0.02	1.22 ± 0.04	1.50 ± 0.03	11.760 ± 0.46	1.08 ± 0.05	1.000 ± 0.00



Gráfica 2. Variación del peso relativo de los órganos de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda, tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

Con la finalidad de determinar un posible daño hepático y/o renal por la administración del extracto, se realizó un análisis de química sanguínea determinando los parámetros de perfil lipídico, función hepática y renal (ver Tabla 11 y Gráfica 3 y 4). El análisis de estos resultados indicó que no existe alteración en los valores de ALP, ALT, BTOT, BDIR, gGT de los animales tratados con el extracto, ya que no existe diferencia significativa respecto al grupo control. En cuanto a los parámetros de la función renal no se observó alteración de los valores de UREA, CREATININA, Ac. ÚRICO y GGT, por lo que el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*, no provocó daño renal. Respecto a los valores de glucosa y perfil lipídico (COL, HDL3, LDL y TRI); no existen cambios significativos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos entre los grupos tratados y grupo blanco. Por lo que nos permite concluir que el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii* no provoca alteración alguna al ser administrado por vía intragástrica.

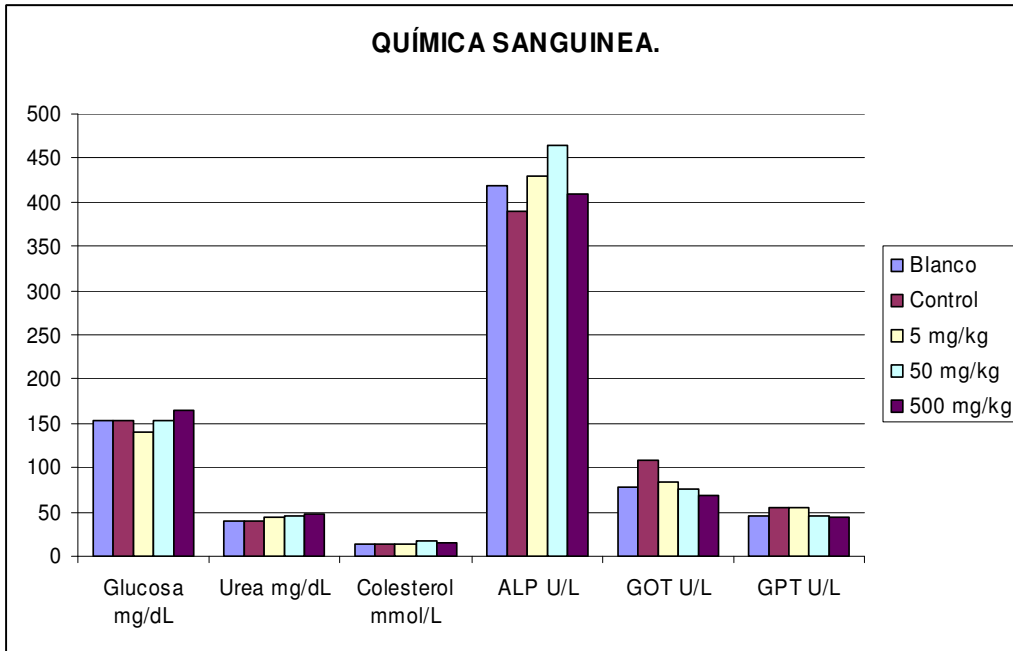
En la biometría hemática se realizó una cuenta total y diferencial de células blancas (Tabla 12, Gráfica 5); sin encontrar cambios significativos entre los grupos control y grupos tratados para ninguno de los parámetros analizados en los animales, lo que indica que no existe efectos tóxicos debido a la administración del extracto. En caso que el extracto hubiese provocado daño hepático se observaría incremento de creatinina, urea, hipercolesterolemia, acumulación de hepatocitos, incremento en los valores de bilirrubina y

disminución de albúmina, alteración en ductos intrahepáticos, incremento de fosfatasa alcalina (ALP).

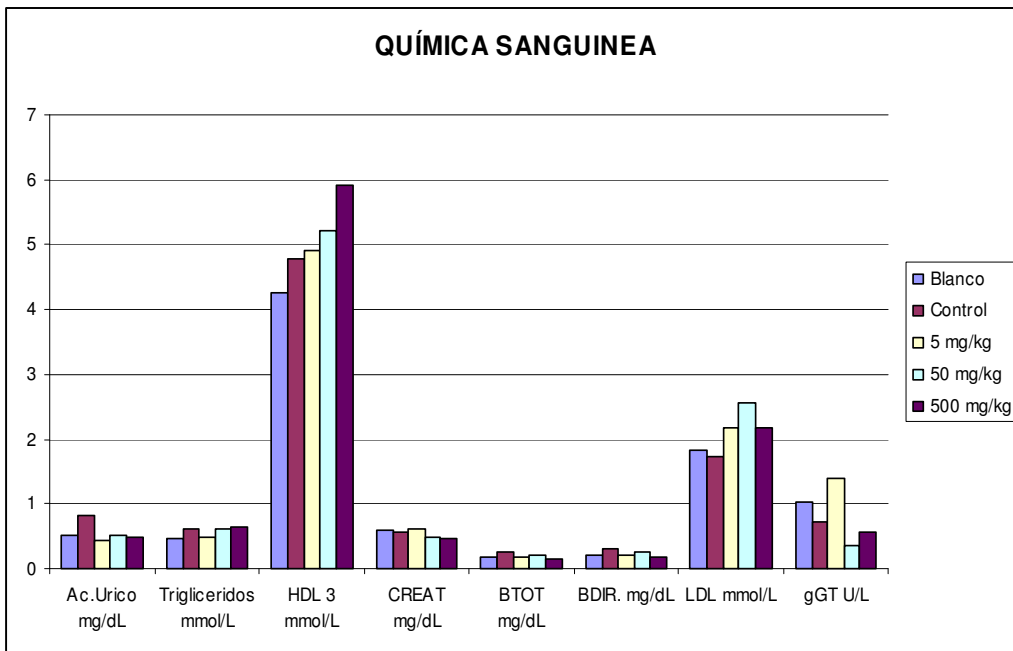
Tabla 11. Valores obtenidos de química sanguínea de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

	Grupo				
	Blanco	Control	5 mg/kg	50 mg/kg	500 mg/kg
Glucosa mg/dL	153.63 ± 12.19	152.97 ± 19.06	140.28 ± 8.06	154.21 ± 2.46	165.33 ± 4.67
Urea mg/dL	40.27 ± 0.96	40.42 ± 2.64	43.41 ± 2.49	45.97 ± 1.36	46.69 ± 3.61
Ac. Urico/dL	0.52 ± 0.06	0.83 ± 0.71	0.44 ± 0.10	0.51 ± 0.13	0.50 ± 0.07
Colesterol mmol/L	13.18 ± 0.79	13.09 ± 0.84	13.82 ± 0.52	16.56 ± 1.23	15.24 ± 0.59
Trigliceridos mmol/L	0.45 ± 0.06	0.62 ± 0.16	0.50 ± 0.08	0.63 ± 0.07	0.64 ± 0.09
HDL3 mmol/L	4.27 ± 0.33	4.78 ± 0.45	4.92 ± 0.15	5.21 ± 0.35	5.90 ± 0.30
CRET mg/dL	0.58 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.61 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.46 ± 0.01
BTOT mg/dL	0.19 ± 0.00	0.26 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.01
BDIR mg/dL	0.21 ± 0.01	0.32 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.17 ± 0.02
LDL mmol/L	1.83 ± 0.10	1.73 ± 0.22	2.18 ± 0.24	2.57 ± 0.21	2.17 ± 0.21
ALP U/L	419.20 ± 24.28	390.40 ± 39.35	429.60 ± 48.72	463.20 ± 66.18	410.00 ± 31.65
GOT U/L	77.82 ± 2.17	107.69 ± 28.78	82.55 ± 3.48	75.07 ± 3.07	68.29 ± 5.26
GPT U/L	44.89 ± 1.28	55.19 ± 9.28	54.76 ± 4.79	45.62 ± 2.80	43.77 ± 2.70
gGT U/L	1.04 ± 0.38	0.72 ± 0.51	1.40 ± 0.54	0.37 ± 0.39	0.57 ± 0.19

HDL3 = Colesterol de alta densidad, CRET = Creatinina, BTOT = Bilirrubina total, BDIR: Bilirrubina, LDL = Colesterol de baja densidad, ALP = Fosfatasa alcalina, gGT = Gamma glutamil transferasa, GOT = Transaminasa glutámico oxalacética, GPT = Transaminasa glutámico piruvica.



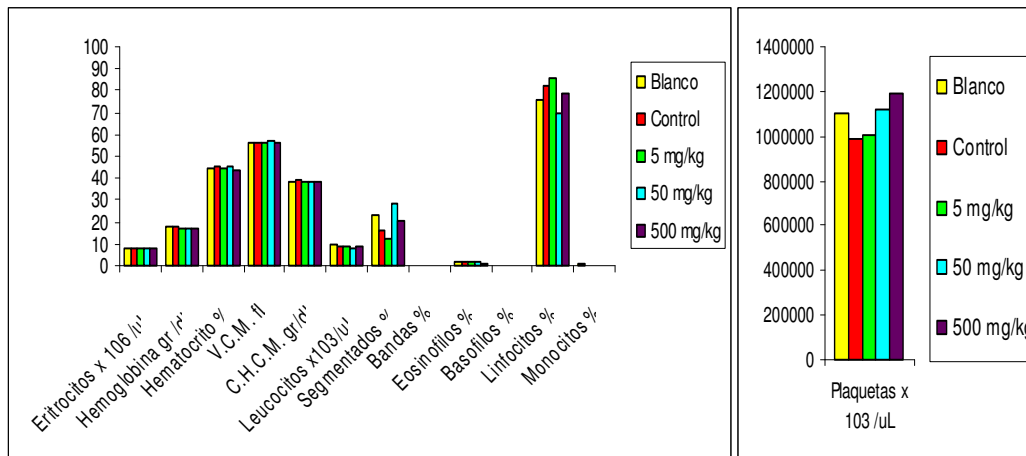
Gráfica 3. Valores obtenidos de la química sanguínea de de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.



Gráfica 4. Valores obtenidos de la química sanguínea de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

Tabla 12. Evaluación de la toxicidad sub-aguda del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*. Cuenta diferencial de células blancas de ratas SD (♂).

	Grupo				
	Blanco	Control	5 mg/kg	50 mg/kg	500 mg/kg
Eritrocitos (x 10 ⁶ /μL)	8.06 ± 0.13	8.14 ± 0.17	7.96 ± 0.22	7.91 ± 0.21	7.83 ± 0.12
Hemoglobina (g/dL)	17.42 ± 0.28	17.86 ± 0.28	17.24 ± 0.49	17.30 ± 0.60	16.96 ± 0.21
Hematocrito (%)	45.04 ± 0.87	45.60 ± 1.00	44.52 ± 1.29	45.10 ± 1.95	43.82 ± 0.66
V.C.M. (fL)	55.88 ± 0.36	56.12 ± 0.34	55.96 ± 0.48	57.07 ± 0.92	55.98 ± 0.36
C.H.C.M. (g/dL)	38.70 ± 0.41	39.16 ± 0.44	38.70 ± 0.26	38.37 ± 0.35	38.72 ± 0.29
Leucocitos (x10 ³ /μL)	10.24 ± 1.54	8.80 ± 2.36	9.22 ± 1.01	8.17 ± 1.39	9.10 ± 1.60
Segmentados (%)	22.80 ± 3.51	16.00 ± 1.51	12.40 ± 0.40	28.67 ± 6.44	20.80 ± 2.65
Bandas (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Eosinófilos (%)	1.60 ± 0.68	1.80 ± 0.49	1.80 ± 0.37	1.67 ± 1.20	0.80 ± 0.20
Basófilos (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Linfocitos (%)	75.60 ± 3.63	82.20 ± 1.83	85.80 ± 0.49	69.67 ± 7.05	78.40 ± 2.73
Monocitos (%)	0.60 ± 0.60	0.00	0.00	0.00	0.00
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	1099600.00 ± 52669.35	991000.00 ± 25436.19	1008800.00 ± 14884.22	1120000.00 ± 17925.77	1192200.00 ± 29721.04


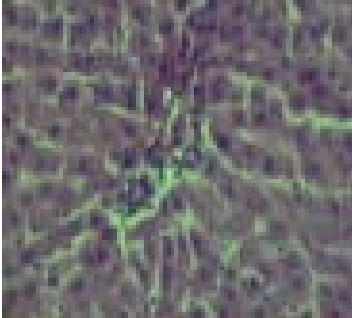
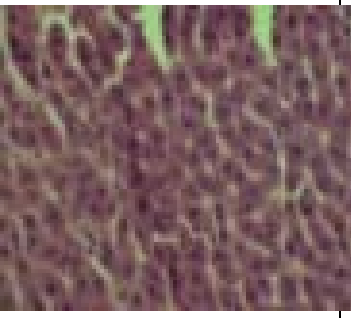


Grafica 5. Valores obtenidos en el estudio de la biometría hemática de ratas SD (♂) en el estudio de toxicidad sub-aguda del extracto EtOH de *R. liebmannii*.

El estudio histopatológico se realizó en los órganos de los grupos blanco, control y para la dosis mas alta (500 mg/mL) de los animales tratados con el extracto etanólico del callo de *R. liebmannii*. Los resultados obtenidos se discuten a continuación:

Histología del hígado. Es uno de los órganos más importantes debido a la actividad metabólica que cumple, lleva a cabo el metabolismo de carbohidratos, nitrógeno y lípidos, elaboración de la bilis (necesaria para la digestión y absorción de grasas), eliminación de sustancias tóxicas y almacena otras moléculas como vitaminas y glucógeno. La circulación hepática ésta formada por el sistema porta compuesto por la triada portal (conductos biliares, vena hepática portal y arteria hepática) que se comunica con la vena central por medio de los sinusoides. El sistema porta constituye entre el 70 y 75 % del flujo sanguíneo proveniente del tracto gastrointestinal y bazo. Los fenómenos infecciosos, tóxicos o inflamatorios alteran la estructura de los espacios porta y del tejido hepático, observándose zonas extensas de tejido fibroso, trastornos vasculares, necrosis, apoptosis e incremento de lípidos hasta del 5 % en peso (Goljan, 2006).

Las observaciones en este órgano (Figura 4) de los animales tratados con la dosis más alta no presentan alteración alguna respecto los grupos control y blanco.

Hígado	Blanco	Control	500 mg/kg
Imagen 40X			

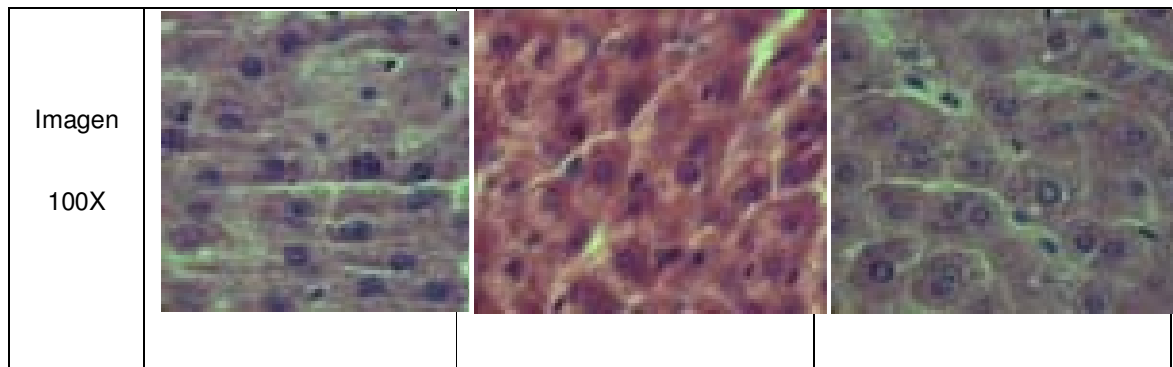


Figura 4. Microcorte sagital de la parte media del lóbulo derecho del hígado de 8 μm Tinción: hematoxilina-eosina. De ratas SD (σ) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmanni*.

Histología de riñón. El riñón cumple con un gran número de funciones en el organismo. Siendo los más importantes: excreción de desechos metabólicos, balance hídrico y mineral, regulación del pH, presión arterial y hematopoyesis; por lo que se analiza la integridad de la nefrona (glomérulo, túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulos colectores). En caso de nefropatías tóxicas se observa necrosis epitelial, que afecta a la mayoría de las células incidiendo primero en los glomérulos y después en los túbulos (Goljan, 2006). En el caso de este estudio se realizó una cuenta total de glomérulos en degradación, haciendo una comparación entre grupos control, blanco y el grupo de la dosis más alta. Además, el riñón ésta compuesto por tres zonas anatómicas: la corteza, la médula y el cáliz, siendo las dos últimas las más expuestas a efectos tóxicos debido a la lentitud del flujo sanguíneo. En este estudio, no se observaron cambios significativos en la médula, en el cáliz y ni en la cuenta de glomérulos entre grupos control y de la dosis más alta (Figura 5).


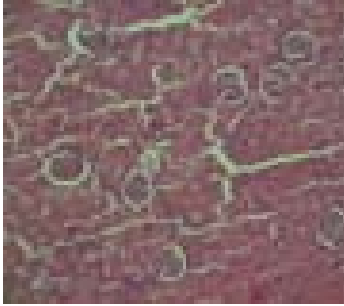

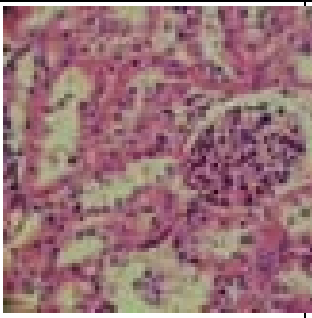

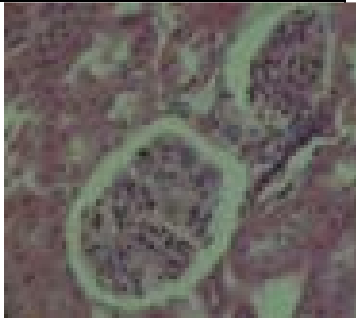


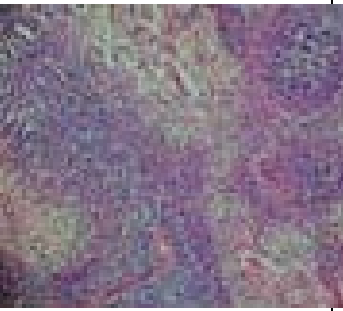
Riñón	Blanco	Control	500 mg/kg
Imagen 40X			
Imagen 100X			

Figura 5. Microcorte transversal de íleon de 8 μm Tinción: hematoxilina-eosina. De ratas SD (σ) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

Histología de bazo. Este órgano desempeña diversas funciones, entre las más importantes están: la maduración y degradación de células sanguíneas, específicamente glóbulos rojos y actividad inmunitaria, ya que en el bazo se producen anticuerpos y además tiene capacidad para fagocitar bacterias y/o agentes externos. En este estudio se debe observar la integridad de la estructura, haciendo énfasis en la diferenciación de la pulpa blanca y pulpa roja. La primera ésta constituida por linfocitos T y B formando cúmulos blanquecinos, mientras que la pulpa roja ésta formada por eritrocitos que le dan una tonalidad rojiza al tejido. También es importante buscar exceso de polimorfonucleares en el centro de la pulpa blanca y exceso de tejido conectivo, los cuales son principales indicadores de algún proceso infeccioso o inflamatorio (Goljan, 2006). En el caso de los animales tratados con el extracto a la dosis más alta, no se observa alguna alteración en este órgano con respecto al grupo blanco y control (Figura 6).

Bazo	Blanco	Control	500 mg/kg
Imagen 20X			

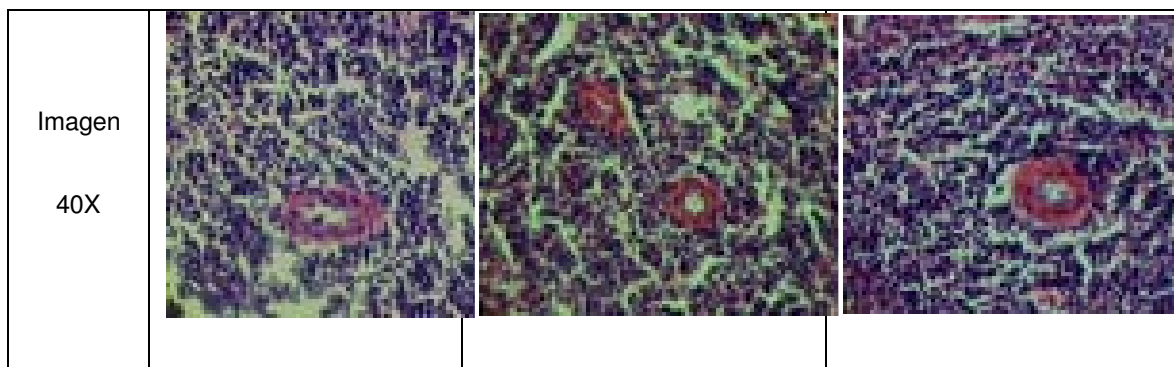


Figura 6. Microcorte transversal de la parte media del bazo de 8 μ m Tinción: hematoxilina-eosina. De ratas SD (β) en el estudio de toxicidad sub-aguda tratados con el extracto EtOH del callo de *R. liebmanni*.

Una vez obtenidos los resultados de las evaluaciones biológicas se procedió a realizar el fraccionamiento químico del extracto. Mediante este proceso de obtuvieron 13 grupos de fracciones primarias con grado de polaridad creciente. El rendimiento de cada fracción se describe en la Tabla 13.

Tabla 13. Fraccionamiento primario del extracto EtOH de *R. liebmanni*.

Clave	Peso (g)	Rendimiento (%)
F-1	0.1492	0.59
F-2	0.9874	3.94
F-3	0.8441	3.37
F-4	0.4766	1.90
F-5	2.9012	11.60
F-6	0.8106	3.24
F-7	1.9413	7.76
F-8	1.5376	6.15
F-9	0.4418	1.76
F-10	0.6139	2.45
F-11	5.2266	20.90
F-12	3.9794	15.91
F-13	1.0092	4.03

Las fracciones primarias alternas F3, F5, F7, F10 y F13 fueron sometidas a evaluación antimicrobiana observándose que únicamente la fracción F3

presentó actividad marginal contra *S. aureus*, *S. pyogenes* y *E. fecalis*, siendo la CMI=4 mg/mL y, contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* resultó un poco más activa, presentando una CMI=2 y 1 mg/mL, respectivamente. El resto de las fracciones resultaron inactivas contra los microorganismos de prueba (Tabla 14). Cabe mencionar que las fracciones F1 y F2 fueron insolubles en DMSO, por lo que no se pudieron someter a evaluación biológica. En este caso se observa que conforme se fracciona el extracto se incrementa un poco la actividad antimicrobiana.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de las fracciones primarias de *R. liebmannii*.

Fracciones primarias	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mg/mL				
	1,2,3	4,5,6	7	8	9
F3*	4	>8	>4	2	1
F5	>4	>8	>4	>4	>4
F7	>4	>8	>4	>4	>4
F10	>4	>8	>4	>4	>4
F13	>4	>8	>4	>4	>4

Controles positivos : gentamicina 5 µg/mL (bacterias), nistatina 8 µg/mL (*C. albicans*), Miconazol 8 µg/mL (hongos). 1 = *S. aureus*, 2 = *S. pyogenes*, 3 = *E. fecalis*, 4 = *E. coli*, 5 = *P. mirabilis*, 6 = *S. typhi*, 7 = *C. albicans*, 8 = *T. mentagrophytes*, 9 = *T. rubrum*.

Dentro de lo descrito en la literatura, a la fecha se ha reportado que algunas especies del género *Rubus* presenta actividad antibacteriana pero no antifúngica, por ejemplo del extracto metanólico de *R. ulmifolius* se aisló el ácido gálico y ácido ferúlico, siendo estos compuestos los responsables de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *B. cereus* (Panizzi et al., 2002); de *R. pinfaensis* se aisló el ácido gálico y ác. ursólico, los cuales inhibieron el crecimiento de *S. aureus* y *B. subtilis* (Richards et al., 1994). La rubanthrona A aislada de *R. ulmifolius* presenta un CMI = 4.5 mg/mL contra *S. aureus* (Flamini et al., 2002).

Intentando buscar ácido gálico y ácido ursólico, en las fracciones activas, se realizó ccf comparativa con muestras de referencia; sin embargo, no se detectó ácido gálico en las fracciones activas, pero se observa la presencia de esteroides y del ácido ursólico al revelar la placa con reactivo de Liebermann-Burchard (Wagner et al., 1984). Cabe mencionar que en F-3 a F-5 está presente como compuesto mayoritario el β -sitosterol.

El efecto espasmolítico se determinó en las fracciones primarias F2 a F8. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 15, en donde se observa que la fracción F3 fue la más activa ($CI_{50} = 6.4 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$), le siguen en actividad la F6 ($CI_{50} = 16.2 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$), F4 ($CI_{50} = 26.7 \pm 12.0 \mu\text{g/mL}$) y F5 ($CI_{50} = 27.9 \pm 4.9 \mu\text{g/mL}$), las demás fracciones resultaron poco activas.

A la fecha, solo se reporta actividad relajante de la fracción polar ($\text{CHCl}_2:\text{MeOH}$ 1:1) obtenida del extracto metanólico de las hojas de *R. idaeus* (Rojas-Vera et al., 2002) pero no se describe el compuesto responsable de este efecto, solo menciona que es un compuesto polar.

Tabla 15. Actividad espasmolítica de las fracciones primarias de *R. liebmannii*.

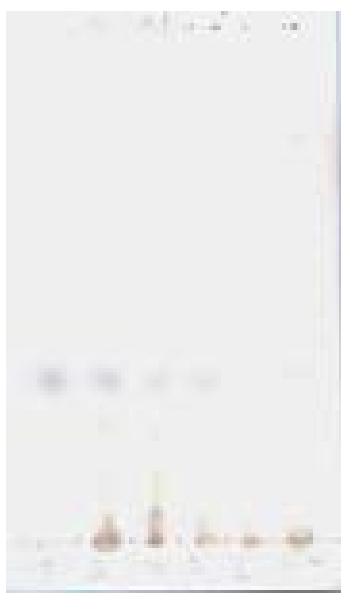
MUESTRA	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
F2	31.60 ± 5.77
F3	6.40 ± 2.90
F4	26.70 ± 12.00
F5	27.90 ± 4.90
F6	16.20 ± 2.70
F7	39.40 ± 7.80
F8	57.80 ± 5.50
F5-6*	26.65 ± 5.44
β -sitosterol	42.81 ± 3.42

Papaverina (control +)	14.1 ±0.35
------------------------	------------

*fracción secundaria

Al observarse efecto antibacteriano, antifúngico y buen efecto espasmolítico en F3 y de F4 a F6 se realizó una ccf comparativa entre las fracciones más activas observándose que las cuatro fracciones primarias presenta un perfil cromatográfico similar (Figura 7) y tomando en cuenta la cantidad de fracción obtenida, se decidió realizar el fraccionamiento secundario F5. Cabe mencionar que en F3 está el β -sitosterol como compuesto mayoritario, por lo que el compuesto puro se sometió a evaluación espasmolítica encontrándose una CI_{50} =42.81 μ g/mL; sin embargo, este efecto no fue mayor al obtenido en las fracciones primarias; esto puede deberse a la presencia de otros compuestos presentes en pequeña cantidad que contribuye al efecto espasmolítico observado para la fracción F3.

Figura 7. Perfil cromatográfico de F3, F4, F5 y F6 del fraccionamiento primario del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.



Fraccionamiento secundario de F5

Este fraccionamiento se realizó con 2 g de F5 en cromatografía en columna de fase normal obteniéndose 11 grupos de fracciones secundarias (F5-1-F5-11), los pesos de las fracciones y rendimientos se describen en la Tabla 16.

Tabla 16. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F5 del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

Clave	Peso (g)	Rendimiento (%)
F5-1	0.0020	0.10
F5-2	0.0017	0.08
F5-3	0.0011	0.05
F5-4	0.0110	0.55
F5-5	0.1329	6.64
*F5-6	1.5329	76.64
F5-7	0.0136	0.68
F5-8	0.0115	0.57
F5-9	0.0229	1.14
F5-10	0.0112	0.56
F5-11	0.0134	0.67

El rendimiento obtenido de este proceso fue bajo para todas las fracciones excepto para la fracción secundaria F5-6, la cual fue sometida a evaluación espasmolítica encontrándose que presentaba una $Cl_{50} = 26.65 \pm 5.44$, valor similar al obtenido en la fracción primaria F5.

Con la finalidad de aislar los compuestos responsables del efecto espasmolítico observado en la fracción secundaria F5-6 se decidió realizar un fraccionamiento terciario de esta fracción vía cromatografía en columna. Para este proceso de 1.2 g de fracción se obtuvieron 14 grupos de fracciones

terciarias (F5-6-1 a F5-6-14); los pesos y rendimientos de las fracciones se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F5-6, del extracto EtOH de *R. liebmannii*.

Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)
F5-6-1	5.2	0.43
F5-6-2	20.4	1.70
F5-6-3-4	85.9	7.15
F5-6-5	41.7	3.47
F5-6-6	43.3	3.60
F5-6-7	105.4	8.78
F5-6-8	126.6	10.55
F5-6-9	109.9	9.15
F5-6-10	156.4	13.03
F5-6-11	192.7	16.05
F5-6-12	74.5	6.20
F5-6-13	61.3	5.10
F5-6-14	15.8	1.31

Mediante este proceso no se logró la purificación de los compuestos por lo que las fracciones terciarias F5-6-5 (40 mg) y F5-6-6 (40 mg) que mostraron un perfil cromatográfico interesante, se sometieron a placas preparativas empleando como sistema de elusión AcOEt:hex 9:1 con 5 gotas de MeOH por cada 5 mL sistema, mediante este proceso se obtuvieron 4 bandas. La banda B y C de la fracción F5-6-5 correspondió al β -sitosterol (8.3 y 1 mg correspondientemente), este compuesto se identificó por comparación en ccf con una muestra comercial (Sigma) (Figura 2), aunque en ninguna de las bandas se obtuvo compuesto puro, uno de ellos fue mayoritario. Los pesos de las bandas se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Pesos de las bandas obtenidas de las TLC's de las fracciones terciarias F5-6-5 y F5-6-6, del extracto EtOH del callo de *R. liebmannii*.

TLC DE F5-6-5	
Muestra	Peso (mg)
F5-6-5-A+A'	11.1
F5-6-5-B	8.3
F5-6-5-C	1
F5-6-5-D	12.6

TLC DE F5-6-6	
Muestra	Peso (mg)
F5-6-6-A	6.9
F5-6-6-B	6.4
F5-6-6-C	4.9
F5-6-6-D	14.8

La banda A fue sometida nuevamente a una TLC con el mismo sistema y en las mismas condiciones, para tratar de purificar los compuestos. Los pesos de las bandas se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Pesos de las bandas obtenidas de la TLC de la fracción F5-6-5-A.

TLC DE F5-6-5-A	
Muestra	Peso (g)
A'	11.1
E	2.8
F	4.1

Figura 8. Perfil cromatográfico de las bandas obtenidas en las TLC's, identificación de β -sitosterol en las bandas C y B, y perfil cromatográfico de la fracción obtenida de la acetilación.



Mediante este proceso se obtuvieron 8 mg de compuesto semipuro, a los cuales se les realizó un análisis de RMN-¹H con la finalidad de determinar parcialmente su estructura química (Espectro 1). En el espectro se observan señales diagnósticas para un triterpenoide; sin embargo, y dada la impureza del compuesto no fue posible determinar el núcleo base del triterpenos. Por revisión bibliográfica acerca de los triterpenos aislados previamente en algunas especies del género *Rubus*, pensamos que este triterpenos puede corresponder algún derivado del ácido torméntico o bien al ácido ursólico. Esta en proceso la purificación de una mayor cantidad de compuesto para obtener el espectro de masas y el de RMN-¹³C y así poder determinar inequívocamente su estructura.

Este trabajo es uno de los pocos que se realizan empleando material vegetal de origen biotecnológico, considerando que mediante este proceso se asegura la producción de materia prima en caso de llegar al desarrollo de un posible fitofármaco. En el caso de *R. liebmannii*, se realizó el estudio de los callos con

la finalidad de determinar el tipo de metabolitos secundarios que se producen en las condiciones nutricionales empleadas.

CONCLUSIÓN

El rendimiento de los extractos es óptimo y de acuerdo al perfil cromatográfico se observa que no existen diferencias entre los callos obtenidos de pecíolos y hojas, aun en condiciones nutricionales diferentes. Los resultados de la evaluación de toxicología aguda indican que el extracto no resultó tóxico, obteniéndose una DL >5 g/kg; la toxicidad subaguda (con duración de 28 días) permitió determinar que el extracto a la máxima concentración evaluada (500 mg/kg) no induce alteraciones a nivel de biometría hemática, química sanguínea y análisis histológico. El análisis de la evaluación antibacteriana y antifúngica permitió determinar que únicamente el extracto íntegro mostró ligera actividad contra hongos y nula actividad contra las bacterias ensayadas, las fracciones primarias resultaron poco activas contra los microorganismos. Respecto a la evaluación de la actividad espasmolítica, se encontró que el extracto fue poco activo ($CI_{50} = 94.42 \pm 14.03 \mu\text{g/mL}$) y la fracción primaria F3 resultó mas activa ($CI_{50} = 6.40 \pm 2.90 \mu\text{g/mL}$) en este mismo modelo. En la fracción F3 está presente como compuesto mayoritario el β -sitosterol, en las fracciones F3 a F5 estuvo presente un triterpenoide, el cual no se pudo caracterizar a pesar de emplear diferentes métodos cromatográficos para su purificación. El espectro de RMN- ^1H del compuesto semipuro, permitio asumir que posiblemente se trata de un triterpeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. Herbario Medicinal Del Instituto Mexicano Del Seguro Social. Primera Edición, México 1994.
- Alanis AD, Calzada F, Cedillo-Rivera R, Meckes M. Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*. 2003; Vol. 17, pp. 681-682.
- Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; Vol. 100, pp. 153-157.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 2005; Vol. 78, pp. 431-441.
- Barbosa E, Calzada F, Campos R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoides isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; Vol. 109, pp. 552-554.
- Barbosa E, Fernando Calzada E, Campos R. Anti-giardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; Vol. 108, pp. 395-397.
- Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall RD, van der Meer IM, Ric de Vos CH. Antioxidants in raspberry: On-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; Vol. 53, pp. 3313-3320.
- Berlin B, Lozoya X, Meckes M, Villareal ML, Tortoriello J. Pharmacological activity of plant species used as admixtures. *Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico: The Gastrointestinal Diseases*. Princeton University Press 1996, pp. 455-470.
- Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. 2004; Vol. 67, pp. 2141-2153.
- Byamukana R, Kiremire BT, Andersen ØM, Steigen A. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005; Vol. 18, pp. 599-605.
- Chen F, Sun Y, Zhao G, Liao X, Hu X, Wu J, Wang Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2007; Vol. 14, pp. 767-778.
- Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn D. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*. 2006; Vol 8, No. 2.

- Choi J, Lee KT, Ha J, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ. Antinociceptive and antiinflammatory effects of Niga-ichigoside F₁ and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2003; Vol. 26, No. 10, pp. 1436-1441.
- Cornejo Garrido J, Jimenez Arellanes A, Meckes Fischer M, Rojas Bibriesca G, Nicasio-Torres P, Tortoriello García J, Said Fernandez S, Mata Cardenas B. Pharmacological potential from *Rubus liebmannii* micropropagated and the callus biomass. *Pharmacologyonline*. 2006; Vol. 3, pp 454-461.
- Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal Ethnopharmacology*. 2007; Vol. 110, pp. 334-342.
- Durham DG, Liu X, Richards ME. A triterpene from *Rubus pinfaensis*. *Phytochemistry*. 1994; Vol. 36, No. 6, pp. 1469-1472.
- Durham DG., Liu IX, Richards ME. Unsaturated e-ring triterpenes from *Rubus pinfaensis*. *Phytochemistry*. 1996; Vol. 42, No. 2, pp. 505-508.
- Flamini G, Catalano S, Caponi C, Panizzi L, Morelli I. Three anthrones from *Rubus ulmifolius*. *Phytochemistry*. 2002; Vol. 59, pp. 873-876.
- Geetha T, Garg A, Chopra K, Pal Kaur I. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research*. 2004; Vol. 556, pp. 65-74.
- Goljan EF. *Rapid Review Panthology*, Elsevier Health Sciences, 2006.
- Gudej J, Tomczyk M. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L. species*. *Archives of Pharmacal Research*. 2004; Vol. 27, Vol. 11, pp 1114-1119.
- Gudej J. Kaempferol and quercetina glycosides from *Rubus idaeus* L. leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2003; Vol. 60, pp. 313-315.
- Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM.
- Kanegusuku M, Sbors D, Bastos ES, de Souza MM, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Monache FD, Niero R. Phytochemical and analgesic activity of extrac, fractions and a 19-hydroxyursane-type triterpenoid obtained from *Rubus rosaefolius* (*Rosaceae*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007; Vol. 30, No. 5, pp 999-1002.
- Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM, Kim SH. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B Virus. *Phytotherapy Research*. 2001; Vol 15, pp. 718-720.

- Li BZ, Wang BG, Jia ZJ. Pentacyclic triterpenoids from *Rubus xanthocarpus*, *Phytochemistry*. 1998; Vol. 49, No. 8, pp. 2477-2481.
- Lien TP, Kamperdick C, Sung TV, Adam G. Triterpenes from *Rubus cochinchinensis*. *Phytochemistry*. 1999; Vol. 50, pp. 463-465.
- Liu Z, Schwimer J, Liu D, Greenway FL, Anthony CT, Woltering EA. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; Vol. 53, pp. 3909-3915.
- Liu Z, Schwimer J, Liu D, Lewis J, Greeaway FL, York DA, Woltering EA. Gallic acid is partially responsible for the antiangiogenic activities of *Rubus* Leaf extract. *Phytotherapy Research*. 2006; Vol. 20, pp. 806-813.
- Llópez N, Puiqrós F, Céspedes E, Arola L, Ardévol A, Bladé C, Salvado MJ. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; Vol 52, pp. 1083-1087.
- Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*. 1983; Vol. 54, pp. 275-287.
- McGhie TK, Rowan DR, Edwards PJ. Structural identification of two major anthocyanin components of boysenberry by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; Vol. 54, pp. 8756-8761.
- Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carragenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 2004; Vol. 11, pp. 446-451.
- Missouri Botanical Garden (Missouri Botanical Garden – w³ – Specimen Data Base - 27 Aug 2007, http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast)
- Missouri Botanical Garden-w³TROPICOS, http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast.
- Morimoto C, Satoh Y, Hara M, Inoue S, Tsujita T, Okuda H. Anti-obese action of raspberry ketone. *Life Sciences*. 2005; Vol. 77, pp. 194-204.
- Müller V, Chavéz JH, Reginatto FH, Zucolotto SM, Niero R, Navarro D, Yunes RA, Schenkel EP, Barardi CR, Zanetti CR, Simões CM. Evaluation of antiviral activity of south American plant extracts against Herpes Simplex Virus Type 1 and Rabies Virus. *Phytotherapy Research*. 2007; Vol 21, pp 970-974.
- Mylnikov SV, Kokko HI, Karenlampi SO, Oparina TI, Davies HV, Stewart D. Rubus fruit juices affect lipid peroxidation in a *Drosophila melanogaster* model *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; Vol. 53, pp. 7728-7733.

- Nalawade SM, Tsay HS. *In vitro* propagation of some important Chinese medical plants and their sustainable usage. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant : Journal of The Tissue Culture Association*. 2004; Vol. 40, pp. 143-154.
- Nam JH, Jung HJ, Choi J, Lee KT, Park HJ. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of Niga-ichigoside F₁ and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2006; Vol. 29, No. 5, pp. 967-970.
- Netzel M, Netzel G, Tian Q, Schwarts S, Konczak I. Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. Identification and quantification of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; Vol. 54, pp. 9820-9826.
- Nicasio P, Jimenez A, Rojas G, Meckes M, Tororiello J. Establecimiento del cultivo de callos de *Rubus liebmannii* y acumulación de catequina y epicatequina, XIII Foro Nacional de Investigación en Salud, Morelia, Michoacán (20-24) Septiembre 2007.
- Nogueira E, Vassiliev VS. Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABA_A-system, *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; Vol. 70, pp. 275-280.
- Ono M, Tateishi M, Masuoka C, Kobatashi H, Igoshi K, Komatsu H, Ito Y, Okawa M, Nohara T. A new triterpene glucosyl ester from the fruit of the blackberry (*Rubus allegheniensis*). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2003; Vol 51, pp. 200-202.
- Panizzi L, Carponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I. *In vivo* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal Ethnopharmacology*. 2002; Vol. 79, pp.165-168.
- Patel AV, Rojas-Vera J, Dacke CG. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry*. 2004; Vol. 11, pp. 1501-1512.
- Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, Torres HN. Anti-Trypanosoma cruzi activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; Vol. 48, pp. 69-74.
- Pérez JN, Alvarado Y, Gómez R, Jiménez EA, Pedro A, Orellana PA. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. 1998; Vol. 1, pp.24-44.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuolera P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; Vol. 56, pp. 3-12.
- Richards RME, Durham DG, Liu X. Antibacterial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. *Planta Medica*. 1994; Vol. 60. pp. 471-473.
- Rojas-Vera J, Patel AV, Dacke CG. Relaxant Activity of Raspberry (*Rubus ideaus*) Leaf Extract in Guinea-pig Ileum *in vitro*. *Phytotherapy Research*. 2002; Vol. 16, pp. 665-668.

- Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74:97-101
- Romero VS. Actividad antiprotozoaria de los productos derivados de las partes aéreas de *Rubus liebmannii* Focke. Tesis de licenciatura. UNAM Facultad de Química, México 2008.
- Rout GR, Samantaray S, Das P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances.* 2000; Vol. 18, pp. 91-120.
- Rzedowski J, Rzedowski G. Flora fanerogámica del valle de México. Compañía editorial continental. 1981, pp. 276-278.
- Standley, Paul C. Trees and strubs of México, Bulletin of the United States National Museum, parte 1-2 (Octubre 11, 1920 a Julio 14, 1922), 23, 328-331(1997).
- Savi LA, Barardi CR, Simoes CM. Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006; Vol. 54, pp. 2552-2557.
- SEMARNAT (Secretaria de medio ambiente y de recursos naturales), www.semanart.gob.mx/pfnm/RubusLiebmannii.html.
- Southwell IA. The constituents of *Rubus rosifolius*. The structure of Rosifoliol, a biogenetically significant sesquiterpenoid. *Agust Journal Chemistry.* 1978; Vol. 31, pp. 2527-2538.
- Thanabhorn S, Jaijoy K, Thamaree S, Ingkaninan K, Panthong A, Acute and subacute of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006; Vol. 107, pp. 370-373.
- Thiem B, Goslinska O. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Ftoterapia.* 2004; Vol. 75, pp. 93-95.
- Venskutonis PR, Dvaranauskaite A, Labokas J. Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania. *Fitoterapia.* 2007; Vol. 78, pp. 162-165.
- Vrhovsek U, Palchetti A, Reniero F, Guillou C, Masuero D, Mattivi. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus ellagitannins* evaluated by optimized acid methanolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006; Vol. 54, pp. 4469-4475.
- Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon Caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002; Vol. 50, pp. 3495-3500.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. *Plant Drug Analysis.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1984, pp. 301 y 304.

- Yau MH, Che CT, Liang SM, Kong YC, Fong WP. An aqueous extract of *Rubus chinguii* fruits protects primary rat hepatocytes against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress. *Life Sciences*. 2002; Vol. 72, pp. 329-338.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; Vol. 52, pp. 255-260.
- Zhou XH, Kasai R, Ohtani K, Tanaka O, Nie RL, Yang CR, Zhou J, Yamasaki K. Oleanane and ursane glucosides from *Rubus* species. *Phytochemistry*. 1992; Vol. 31, No. 10 pp. 3642-3644.