

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EL
EFECTO CITOTÓXICO SOBRE LÍNEAS CELULARES
TUMORALES DE UN EXTRACTO RICO EN POLIFENOLES DEL
FRUTO *BACTRIS GUINEENSIS***

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar por el grado de
Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Farmacología

MARÍA SOLEDAD QUESADA MORÚA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

DEDICATORIA

Para Tini y Ale, que nunca se cansaron de preguntar por este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Silvia, Gabriela, Ana Mercedes, Lorena por haberme acompañado y ayudado en todo momento y en toda circunstancia.

A Ale por su infinita paciencia.

A todas y cada una de las personas que me ayudaron, corrigieron, aleccionaron, alentaron, y no me dejaron claudicar.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Farmacología”



Dra. Cristina Herrera Arias

Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado



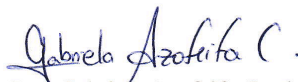
Dra. Silvia Quesada Mora

Directora de Tesis



Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal

Asesora



Dra. Gabriela Azofeifa Cordero

Asesora



Dra. Cecilia Díaz Oreiro

Directora Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas



Ma. Soledad Quesada Morúa

Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA.....	25
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
BIBLIOGRAFÍA	67
RESEARCH REPORT <i>Bactris guineensis</i> (Arecacea) extract: polyphenol characterization, antioxidant capacity and cytotoxicity in cancer cell lines. <i>Journal of Berry Research. 2020</i>	93

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos bioactivos de gran interés por sus potenciales efectos benéficos para la salud, particularmente en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y el cáncer. El *Bactris guineensis*, conocido como güiscoyol, es un fruto que se encuentra en el Pacífico centroamericano y en el norte de Suramérica. Los pocos estudios que han caracterizado la composición fitoquímica del *Bactris guineensis* han determinado que tiene un alto contenido en polifenoles, específicamente antocianinas. Esta investigación evaluó la actividad biológica de un extracto de polifenoles del fruto de güiscoyol, mediante la determinación de sus propiedades antioxidantes y su posible efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales. Se utilizaron frutos maduros recolectados en Guanacaste para realizar una extracción de polifenoles (EPG). Su caracterización fitoquímica se realizó mediante de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Se determinó la cantidad de polifenoles y antocianinas totales presentes en el EPG. La actividad antioxidante del EPG se estableció mediante pruebas fisicoquímicas con los métodos DPPH, determinación de óxido nítrico y ORAC; así como mediante la determinación de la inhibición intracelular de las especies reactivas al oxígeno (ROS) y la inhibición sobre la peroxidación lipídica en eritrocitos y en homogenizados de hígado de rata. La actividad citotóxica se evaluó por ensayos con MTT en dos líneas celulares tumorales y una no tumoral como control. Adicionalmente, se evaluó el efecto pro-apoptótico del extracto mediante citometría de flujo y tinción con anexina/PI. En el extracto se identificaron catequinas, epicatequinas; dímeros, trímeros, tetrameros de procianidinas, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y quercetina-3-rutinósido. El contenido de polifenoles totales fue de $551,3 \pm 16,3$ mg equivalentes de ácido gálico/100 g extracto y el de antocianinas de $438,3 \pm 8,3$ mg equivalentes de cianidina-3-glucósido/100 g extracto. El EPG presentó un valor de ORAC de 9791 ± 390 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto. A una concentración de $3,3 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}), el EPG logró reducir al 50% la concentración del radical DPPH y la inhibición de la producción de óxido nítrico a una concentración de 324 ± 11 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}). La concentración para disminuir al 50% los ROS intracelulares fue de 153 ± 13 $\mu\text{g/mL}$, y para disminuir al 50% la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, en homogenizados de hígado de rata, fue de $52,8 \pm 3,7$ $\mu\text{g/mL}$. A una concentración de $12,5$ $\mu\text{g/mL}$, el EPG inhibió la hemólisis de eritrocitos de forma similar a la quercetina 40 μM . Los ensayos de citotoxicidad mostraron un IC_{50} de $113,6 \pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$ para células de adenocarcinoma gástrico (AGS) y $16,2 \pm 1,5$ $\mu\text{g/mL}$ para células de adenocarcinomas de colon metastásico (SW620). La citotoxicidad sobre células no tumorales mostró un IC_{50} de $175,8 \pm 16,4$ $\mu\text{g/mL}$. Un 69% de las células evidenció estar en un proceso de apoptosis después de un tratamiento por 48 h con 20 $\mu\text{g/mL}$ del extracto. El güiscoyol, por su alto contenido en polifenoles y su actividad antioxidante y citotóxica selectiva podría considerarse una fruta con un alto potencial como antioxidante y alimento funcional. Sin embargo, es necesario validar los resultados del presente estudio en modelos *in vivo*.

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1.</i> Contenido de polifenoles totales y antocianinas en el EPG	38
<i>Cuadro 2.</i> Identificación de flavanoides presentes en el EPG por espectrometría de masas	39
<i>Cuadro 3.</i> Identificación de flavanoides presentes en el EPG por espectrometría de masas	40
<i>Cuadro 4.</i> Actividad antioxidante del EPG por tres métodos fisicoquímicos <i>in vitro</i> . .	42

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Güiscoyol recolectado en la provincia de Guanacaste	4
<i>Figura 2.</i> Estructura básica de los flavonoides.....	9
<i>Figura 3.</i> Clasificación de polifenoles	10
<i>Figura 5.</i> Relación estructura-actividad de la quercetina.....	13
<i>Figura 6.</i> Estructura básica de las antocianinas	14
<i>Figura 7.</i> Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis	19
<i>Figura 8.</i> Relación entre las vías del factor de transcripción NF- κ B, MAPK y apoptosis ..	20
<i>Figura 9.</i> Relación entre las MAPK y la actividad de compuestos antioxidantes	21
<i>Figura 10.</i> Actividad barredora del EPG sobre el óxido nítrico.	41
<i>Figura 11.</i> Actividad barredora del EPG sobre el radical DPPH.....	42
<i>Figura 12.</i> Efecto protector del EPG de la acción de ROS intracelulares en células Vero..	43
<i>Figura 13.</i> Efecto protector del EPG contra la peroxidación lipídica en eritrocitos	44
<i>Figura 14.</i> Efecto protector del EPG contra la peroxidación lipídica en homogenizados de hígado de rata.....	45
<i>Figura 15.</i> Efecto del EPG sobre la viabilidad de tres líneas celulares.....	46
<i>Figura 16.</i> Valores de IC ₅₀ del EPG en tres líneas celulares.....	47
<i>Figura 17.</i> Efecto apoptótico del EPG y la camptotecina en la línea celular SW620.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A+ : anexina positivo	ECV : enfermedades cardiovasculares
A- : anexina negativo	EDTA : ácido etilendiaminotetraacético
AAPH : clorhidrato de 2,2-azobis-2-metilpropanimidamida	EGCG : galoepigalocatequina
AGS : línea celular de adenocarcinoma gástrico	EPG : extracto de polifenoles del güiscoyol
Apaf1 : proteína activadora de la apoptosis1	ERK1/2 : quinasa regulada por señales extracelulares
ARE : antioxidant responsive element	ERYCA : Prueba actividad antioxidante en eritrocitos
AUC : área bajo la curva	ESI-Q-TOF/MS : electrospray Ionization and Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry
BH3 : miembro de la familia de proteínas BLC2	FAD : proteína con dominio de muerte celular asociada a Fas
BLC2 : célula-B CLL/linfoma 2	Fas : proteína de superficie con dominio de muerte celular
BAK : Bcl-2 antagonist killer 1	FasL : ligando de proteína de superficie con dominio de muerte celular
BAX : Bcl-2-associated x protein	FDA : Federal Drug Administration
Caco 2 : línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano	FOS : proteína de la familia Ap1
Cat : catequina	HCT116 : línea celular de carcinoma colorectal
CRE : elemento de respuesta a AMP cíclico	HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución
DCF : 2'7'-difluoresceína	HT29 : línea celular de carcinoma colorectal
DCFDA : 2'-7' diclorofluoresceína diacetato	IC₅₀ : concentración inhibitoria 50%
DCFHDA : 2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato	IS : índice de selectividad
DE : desviación estándar	PI : yoduro de propidio
DPPH : 1,1-difenil-2-picrilhidrazil	IkB : inhibidor kappa B
CITA : Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos	
eCat : epicatequina	

GAE: equivalentes de ácido gálico

JUN: proteína de la familia Ap1

LDL: lipoproteína de baja densidad

LD₅₀: dosis letal 50 %

LoVo/ADR: línea celular de carcinoma colorectal multiresistente

MAPK: proteinkinasa activada por mitógenos

MDA: malondialdehído

MCP: muerte celular programada

MS: materia seca

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolin bromuro

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B derivadas

NK: células asesinas

NO: óxido nítrico

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

p53: proteína supresora de tumores

QE: equivalentes de quercetina

ROS: especies reactivas de oxígeno

RAS: actividad barredora de radicales

SNP: nitroprusiato de sodio

SW620: línea celular de carcinoma colorectal metastásico

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBHP: *tert*-butil hidroperóxido

TCA: ácido tricloroacético

TE: equivalentes de trolox

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

UI: unidades internacionales

UPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento

XAD-7: resina macroporosa de polímero etilenglicol dimetil acrilato

5-FU: 5 fluorouracilo



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, María Soledad Quesada Morúa, con cédula de identidad 1-0933-0937, en mi condición de autor del TFG titulado Determinación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales de un extracto rico en polifenoles del fruto *Bactris Guineensis*.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO*

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

anifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Ma. Soledad Quesada Morúa

Número de Carné: 952297

Número de cédula: 1-0933-0937

Correo Electrónico: mqm220395@gmail.com

Fecha: 07 de setiembre de 2020

Número de teléfono: 8993-2594

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Silvia Quesada Mora.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

INTRODUCCIÓN

La aparición y la severidad de muchas enfermedades que afectan a los seres humanos se asocia con un estado fisiológico caracterizado por daño oxidativo (1,2), producido por un desequilibrio entre las velocidades de producción y de eliminación de especies altamente reactivas al oxígeno (ROS). El aumento en la producción de radicales libres y ROS, junto con la disminución de las defensas antioxidantes del organismo provoca daño en macromoléculas, alteraciones en el metabolismo y en la fisiología normal (3,4). En situación normal, la producción de radicales libres es constante en una concentración determinada y es neutralizada por las defensas antioxidantes endógenas y exógenas. Los antioxidantes exógenos ingresan al organismo por la vía de los alimentos y pueden neutralizar parte de este daño (3,5–8).

El consumo de frutas ricas en antioxidantes podría tener un efecto beneficioso en la prevención de muchas enfermedades, por su contenido de polifenoles. Estudios epidemiológicos han resaltado que el consumo de este tipo de compuestos reduce el riesgo de aparición de ciertas enfermedades, sobre todo las de origen cardiovascular y tumoral (9–12).

La mayoría de los reportes de la capacidad antioxidante y propiedades biológicas de polifenoles provienen de frutas de otras regiones del mundo y son pocos los estudios que caracterizan la actividad biológica de las frutas tradicionales costarricenses. La determinación de estas actividades biológicas permite la comparación con otras frutas ampliamente estudiadas a nivel internacional y puede resultar en el hallazgo de un alimento a ser incorporado en la dieta diaria de la población. Este trabajo pretende determinar el perfil básico de capacidad antioxidante y el potencial citotóxico en líneas celulares tumorales del güiscoyol (*Bactris guineensis*), una fruta que se encuentra en nuestro país.

MARCO TEÓRICO

Bactris spp.

El género *Bactris* pertenece a la familia Arecaceae, subfamilia Arecoideae, tribu Cocoseae, subtribu Bactridinae (13). Este género tiene una gran variedad de especies distribuidas principalmente en América Central y América del Sur; se encuentra en zonas de poca o mediana elevación (entre 10 y 1000 m.s.n.m) (14–18), siendo la zona del Amazonas la que tiene mayor cantidad de especies (13).

Las plantas de este género tienen tallos espinosos, delgados y bajos, con hojas según la especie y flores de vida corta. Los frutos determinan la relación taxonómica entre las especies, primordialmente por su coloración, la cual abarca una gama de colores desde amarillos, anaranjados y rojos, verdes, morados, cafés y hasta negros. La coloración varía con la ubicación geográfica, observándose frutos anaranjados en la costa pacífica de Colombia y Ecuador y la costa atlántica de Centroamérica, mientras que en el Amazonas predominan las especies de frutos morados. Su composición es variada y puede tener diferencias en cuanto a la cantidad de fibra y jugo (15).

Estas especies reciben diferentes nombres comunes dependiendo del país en el que se encuentren y se les reportan usos populares muy variados, desde la elaboración de collares y pisos, construcción de canastas con su palma, hasta el consumo de sus frutos en alimentos y bebidas; se les conoce una variedad de usos etnomédicos desde el alivio de dolor estomacal hasta antídoto para picaduras de serpientes (15).

La especie más conocida es el *Bactris gasipaes* que tiene dos variedades: una cultivada en Centroamérica y el norte de Suramérica y otra localizada en la región andina. Sus frutos, conocidos popularmente en Costa Rica con el nombre de pejibaye, son parte importante de la dieta de estas regiones y en algún momento fueron de suma importancia en ceremonias y rituales indígenas (13,19,20). El pejibaye tiene una composición fitoquímica variada, es una fruta con un bajo índice glicémico y alto valor energético. Tiene un alto valor nutritivo por ser fuente de grasas, minerales y compuestos bioactivos como los carotenoides.

La literatura reporta que este fruto es fuente de lisina, metionina, triptófano, potasio, selenio, hierro y cromo; almidón, fibra soluble, niacina, retinol, riboflavina y tiamina. Contiene ácidos grasos omega 3, 6 y 9, entre ellos ácido oleico, palmítico, linoleico, palmitoleico, linolénico y esteárico; posee diversos esteroides como colesterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Dentro de sus componentes más importantes se encuentran los carotenoides que le dan su color característico. Su pulpa o mesocarpo es rico en β -caroteno y licopeno en niveles variables, siendo mayores cuando la cáscara y la pulpa presentan una coloración más roja (16,20–22).

Otra especie de esta familia, ampliamente utilizada como alimento, es el *Bactris guineensis*. También conocida como *Bactris minor* (23), es una palma mediana, de tallo erecto, delgado y cubierto de espinas, de poca altura que alcanza su madurez alrededor de los 5 años (15,17).

Se puede encontrar en el pacífico centroamericano de Nicaragua y Costa Rica; en Panamá, el norte de Colombia y Venezuela, en áreas con estaciones secas marcadas (14,24,25), a menos de 100 m.s.n. (15,18). En el caribe colombiano se le conoce como palma de lata, corozo de lata, uvita de lata, coyol, lata; de sus frutos se elabora una bebida refrescante para consumo humano, confituras, dulces artesanales (15,17,24,26) y bebidas alcohólicas o fermentadas (1,18,19,24); su madera se ha utilizado en la construcción de viviendas (15,18).

En Costa Rica se tienen varias especies de *Bactris*, comúnmente en las provincias de Guanacaste, Puntarenas, Alajuela, Heredia y Limón (14). Entre ellas, se reconocen el *Bactris gasipaes* y el *Bactris guineensis* (19). Esta última especie es comúnmente conocida como güiscoyol, huiscoyol, uvita, uvita de monte o vizcoyol y es posible encontrarla en la vertiente del Pacífico, en bosques secos o de transición, desde el norte del país hasta cerca de Barranca y Tivives (1,25); así como en los márgenes de los caminos hacia Playa Blanca en el Sector Murciélagos y hacia Playa Potrero Grande en el Sector Santa Elena, en Guanacaste (25).

Los frutos del *Bactris guineensis* son comestibles, miden de 2 a 6 cm de largo, tienen diversas coloraciones desde rojas hasta moradas y se encuentran en racimos; en su interior hay una sola semilla rodeada por una pulpa fibrosa de sabor ácido (1,15,17,24).



Figura 1. Güiscoyol recolectado en la provincia de Guanacaste

Los pocos estudios que han caracterizado la composición fitoquímica del *Bactris guineensis* han determinado la presencia de polifenoles, específicamente antocianinas, en el fruto. En Colombia, Sequeda-Castañeda *et al.* (2010) (17) determinaron una cantidad de polifenoles totales de $78,1 \pm 4,3$ de equivalentes de ácido gálico (GAE) en 100 g de un extracto de pulpa cruda de güiscoyol. Igualmente reportaron una mezcla de antocianinas en el extracto, dos en mayor proporción: la cianidina-3-rutinósido y la cianidina-3-glucósido y cuatro minoritarias: peonidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-(6-O-malonil) glucósido, y la cianidina-3-sambubiósido (17,18,24).

La presencia de estos compuestos fue correlacionada con la actividad antioxidante del güiscoyol por Osorio *et al.* (2011) (18), Rojano *et al.* (2012) (24) y Sequeda-Castañeda *et al.* (2016) (23), mediante su actividad barredora de los radicales DPPH y ABTS. Un extracto rico en antocianinas causó una reducción total del DPPH en menos de 15 min, principalmente por la acción de las antocianinas mayoritarias, mientras que la cianidina-3-glucósido fue la más activa para barrer el radical ABTS. El extracto metanólico de *B. guineensis* demostró una actividad antioxidante ligeramente mayor que la actividad de la vitamina C (23).

Según Rojano *et al.* (2012) (24), el contenido de polifenoles totales en la fruta de güiscol es responsable de la actividad contra radicales de oxígeno, medida por el método ORAC, la cual es similar a la que presentan otras frutas del tipo de las cerezas y duplica los valores obtenidos con infusiones acuosas de variedades de café colombiano (24).

El trabajo de Sequeda-Castañeda *et al.* (2016) (23) determinó la actividad antioxidante del güiscol en una línea celular sometida a estrés oxidativo generado por un estímulo tóxico. También es el primero en reportar la actividad protectora del *B. guineensis* sobre la viabilidad de la línea celular de fibrosarcoma HT1080, sometida al efecto de la rotenona. A una concentración de 100 µg/mL, el extracto evitó la disminución en la viabilidad celular inducida por el pesticida (23).

López *et al.* (2017) (27) evaluaron la actividad neuroprotectora del güiscol. Demostraron que extractos de pulpa y semilla de *B. guineensis* protegen las neuronas y los astrocitos del daño causado por el estrés oxidativo inducido por rotenona.

Antioxidantes

Generalidades

Los seres humanos, al igual que todas las especies aerobias, necesitan de oxígeno para sus funciones vitales. La utilización y el metabolismo del oxígeno conlleva la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que tienen funciones beneficiosas en procesos fisiológicos de neurotransmisión, de respuesta inmunológica a infecciones y al crecimiento de tumores. El balance entre las reacciones de oxidación y reducción es importante para mantener un adecuado nivel de ROS en el cuerpo que permita la activación de sus defensas antioxidantes endógenas y con ello la disminución en el riesgo de aparición de enfermedades crónicas (5,6,26,28–30). Sin embargo, también tienen efectos perjudiciales si no son adecuadamente contrarrestadas por estos sistemas de defensa antioxidante del organismo. Un aumento de estas especies reactivas, junto con la disminución de las defensas antioxidantes del organismo, provoca daño en macromoléculas, alteraciones en el metabolismo y en la fisiología normal (3,4,31), causando procesos como la peroxidación lipídica, la oxidación a proteínas (6,9,32,33), el daño a la estructura del ADN y a la

modulación de genes, entre otros. Todos estos daños a las macromoléculas se han relacionado con enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, el cáncer, el asma, la artritis, los eventos cardiovasculares y otras patologías (3,9,33–35).

El sistema antioxidante puede ser reforzado o debilitado por factores externos como la dieta, el ejercicio, el tabaquismo, el consumo de vitaminas, entre otros. En la actualidad es bien conocido que el desarrollo, la aparición y la severidad de muchas enfermedades que afectan a los seres humanos están asociadas a desbalances en los sistemas antioxidantes (36).

De forma general, un antioxidante es aquella sustancia que a bajas concentraciones retrasa o inhibe de manera considerable la oxidación provocada por los radicales libres, degradándolos o transformándolos en productos menos reactivos (37–41). Pueden actuar de distintas maneras, entre ellas removiendo o disminuyendo la concentración local de oxígeno u oxígeno singlete y de otras especies reactivas al oxígeno; removiendo o neutralizando iones metálicos con acción catalítica; barriendo radicales libres que inician reacciones de oxidación; rompiendo la reacción en cadena de la oxidación; reparando biomoléculas dañadas por las ROS; disminuyendo las especies reactivas al nitrógeno (3,7,8,8,37,42,43), modulando la expresión de genes relacionados con las defensas antioxidantes endógenas, alterando la concentración de sustancias reductoras y afectando los mecanismos de señalización celular. Sus efectos dependen de su estructura química, del material a oxidar, la concentración del oxidante y el ambiente en el que actúen los oxidantes (5,29,30,37,44,45).

Los antioxidantes pueden encontrarse en el organismo (endógenos) o pueden ser adquiridos externamente por medio de la dieta (exógenos) (3,5,6,33). Entre los antioxidantes endógenos se encuentran una serie de complejos enzimáticos que controlan y regulan permanentemente la producción de ROS y otros radicales libres en la célula (6). Estos complejos incluyen enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, o bien moléculas como glutatión, la coenzima Q y proteínas antioxidantes como la transferrina, la lactoferrina, la ceruloplasmina y la albúmina (5,46–50).

Los antioxidantes exógenos son muy diversos y entre los más importantes se encuentran: el ácido ascórbico que se ha relacionado con la prevención de enfermedades

como el cáncer, la enfermedad cardíaca y el resfrío común (7,9,33); los tocoferoles, unos de los antioxidantes más abundantes que forman parte de las membranas biológicas y tienen funciones protectoras sobre sus ácidos grasos poliinsaturados (3,9,33); los carotenoides, que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades cuya etiología comienza con el daño oxidativo, incluyendo el cáncer, la aterosclerosis, alteraciones oculares como cataratas o degeneración macular y el envejecimiento prematuro de la piel (9,51,52); y los polifenoles, que pueden retardar o prevenir reacciones de oxidación y formar radicales estables (53–55).

Polifenoles

Los polifenoles constituyen un grupo variado de metabolitos secundarios cuya estructura común se compone de un anillo aromático, varios grupos hidroxilo y diversas sustituciones (9,49,56–60); son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en vegetales, frutas, té, vino, cacao, semillas y otros alimentos (59,61–66). En las plantas cumplen funciones de defensa contra el daño ocasionado por los radicales libres a las proteínas, carbohidratos, lípidos y al ADN; son generados como reacción a condiciones adversas como las bajas temperaturas, la luz ultravioleta, una nutrición pobre, el ataque de patógenos, las lesiones a la integridad celular e inclusive el daño debido a su propio metabolismo (10,54,67,68).

Los polifenoles neutralizan especies reactivas al oxígeno y al nitrógeno. Su mecanismo como antioxidantes parece estar relacionado con su capacidad para donar hidrógeno y quelar iones metálicos (9,67,69–71), transformándose en radicales estables que no intervienen en otras reacciones fácilmente (49,53,55,69,72). También activan vías enzimáticas de forma independiente a sus propiedades antioxidantes; regulan la producción de óxido nítrico, modulan la actividad de los leucocitos, la inhibición de la proliferación celular y la angiogénesis, entre otras acciones (73,74). Pueden actuar como prooxidantes, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren como: alta concentración del polifenol, presencia de iones metálicos, pH elevado, daño sostenido, la fuente de radicales libres, entre otras (9,62,68,75,76). De esta manera, causan acciones como: daño al ADN,

reacciones de peroxidación lipídica (68,77) e inducción de apoptosis, propiedad que podría explicar su potencial actividad citotóxica (53,77–80).

Clasificación de los polifenoles

Los polifenoles se dividen, según su estructura, en: ácidos fenólicos, lignanos, cumarinas y flavonoides (3,9,11,57,71,72,78).

Los ácidos fenólicos se dividen en derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico, cuyos compuestos son comunes en plantas, especialmente los de estos últimos. Ambos grupos tienen diferencias en los patrones de hidroxilación y metoxilación de sus anillos aromáticos. El ácido gálico es el más común de los ácidos fenólicos y es el precursor de taninos hidrolizables (galotaninos, elagitaninos y otros derivados de ácido gálico), hidroxicinamatos (ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico) y estilbenos (resveratrol y sus derivados). Los ácidos fenólicos se comportan como antioxidantes gracias a las sustituciones hidroxilo y metoxilo en el anillo aromático, principalmente barriendo radicales libres al donar un átomo de hidrógeno (53,56,59).

Los lignanos tienen su origen en el ácido cinámico y se componen de dos unidades de un anillo de fenilpropano, con diferentes sustituciones en sus anillos aromáticos. Se encuentran en su forma glicosilada en muchas plantas (81,82).

Las cumarinas (1,2-benzopironas o fenilpropanoides) constituyen una clase de compuestos fenólicos de bencenos fusionados y anillos de alfa pironas. Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas como metabolitos secundarios y presentan una gran diversidad de actividades biológicas. Se ha reportado que estas actividades tienen relación con las sustituciones presentes en su estructura básica. Las hidroxicumarinas, por ejemplo, son antioxidantes potentes y pueden prevenir el daño oxidativo al barrer radicales libres (83–85).

Los flavonoides están conformados por compuestos de 15 carbonos con dos anillos aromáticos unidos por un puente de 3 carbonos (C6-C3-C6), con múltiples sustituciones en el anillo B (53,56,68,72) (figura 2).

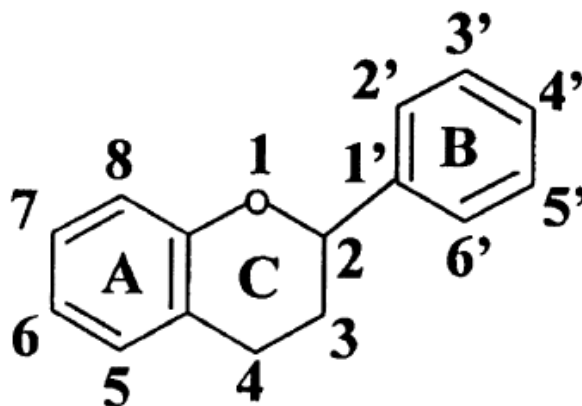


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides
Tomado de Heim *et al.* (2002) (71)

Estas particularidades en su estructura subdividen a los flavonoides en tres grupos principales: estilbenos, taninos hidrolizables y flavanoides. A su vez los flavanoides se dividen en: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavononoles, flavanoles o catequinas y antocianinas (12,45,56,59,73,86), tal como se observa en la figura 3.

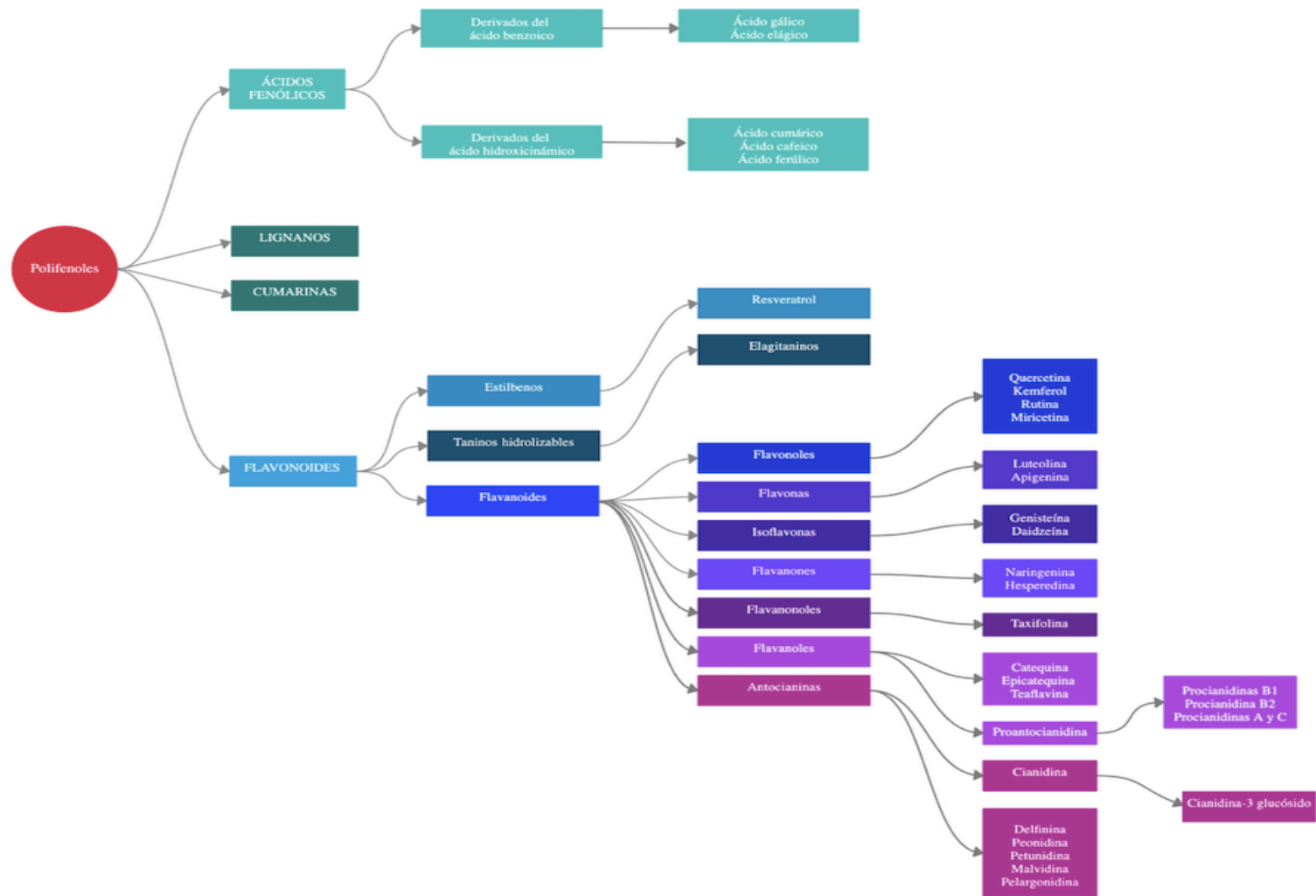


Figura 3. Clasificación de polifenoles
Modificado de Shahidi y Ambigaipalan (2015) (59)

Los flavonoles son la subclase más extensa de flavonoides entre las plantas, con estructuras y sustituciones variadas; los principales flavonoles en la dieta son el kemferol, la quercetina y la miricetina. Otro subgrupo, las flavanonas, se encuentra en altas concentraciones en los cítricos, siendo la más común la hesperetina-7-O-rutósido. Por su parte, las isoflavonas se encuentran exclusivamente en las leguminosas como la soya (56,86,87).

Los flavanoles comprenden la subclase más extensa desde el punto de vista estructural, desde los más simples como la catequina, hasta los más complejos como las proantocianidinas, de las cuales la más importante es la procianidina formada por dos o más moléculas de catequina y epicatequinas. Estas últimas se encuentran principalmente en frutas como las peras, manzanas, nectarinas, melocotones, cerezas, ciruelas, mangos, entre muchas otras; y en menor grado en vegetales y semillas, como avellanas, pecanas, pistachos, almendras y otras (12,56,71,72).

Las antocianidinas son pigmentos hidrosolubles ampliamente distribuidos en las plantas que se encuentran comúnmente en conjugados glicosilados conocidos como antocianinas. Las antocianinas son, por lo general, las responsables de la coloración azulada, roja, morada (88,89) o hasta negra de las plantas o frutas que las contienen, dependiendo del pH y la presencia de co-pigmentos (90). Existen cientos de antocianinas en la naturaleza, siendo las más comunes la pelargonidina, cianidina, delfinina, peonina, petunidina y malvidina (59,86,88,89). Se pueden obtener de vinos tintos, de cebolla roja, de algunas variedades oscuras de soya y frijoles, de moras, frambuesas, arándanos, fresas y de otras bayas (12,56,72,91), además de uvas rojas y frutos tropicales como el güiscoyol (18,89) así como de otra gran variedad de frutas y vegetales.

Relación estructura-actividad de polifenoles

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más grandes de polifenoles, con capacidad antioxidante *in vitro* más potente que las vitaminas C y E (43,56). Los flavonoides pueden barrer o inhibir la formación de radicales superóxido, perhidroxilo, peróxido de hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, peroxilo y oxígeno singulete (49,86), dependiendo de su estructura básica y sustituciones.

La estructura básica de los flavonoides consta de tres anillos fenólicos (figura 2): dos anillos bencénicos (A, B) unidos por un pirano heterocíclico (C). La clasificación en diferentes compuestos depende de la presencia de un doble enlace en el anillo C entre los carbonos 2 y 3, las múltiples hidroxilaciones en el anillo B; diversas metoxilaciones y glicosilaciones con glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y rutosa, de preferencia en la posición 3 (menos frecuentemente en la 7); y otras sustituciones (figura 4). En conjunto, estas particularidades en su estructura determinan el potencial antioxidante (49,58,72,86,92) y las propiedades biológicas (62,72,73).

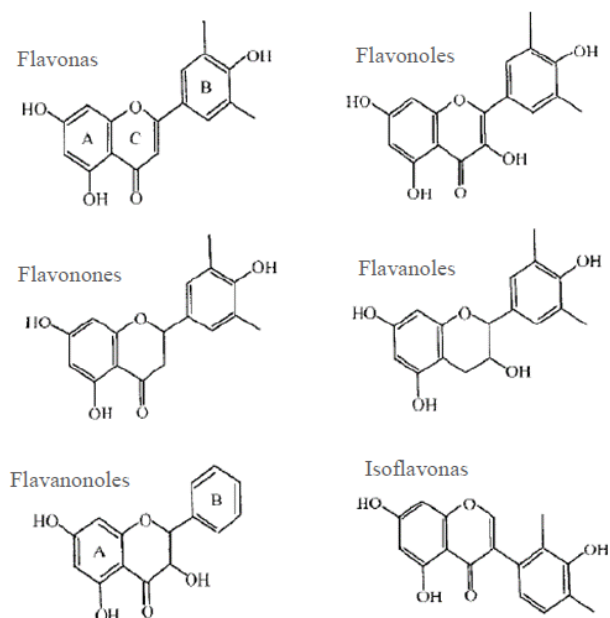


Figura 4. Estructuras de distintos flavonoides

Modificado de Ren *et al.* (2003) (93)

El potencial antioxidante de los flavonoides en medios hidrofílicos es mayor cuantas más hidroxilaciones tenga el anillo B, ya que dispone de más cantidad de hidrógenos y electrones para donar y formar así un radical flavonoide estable, que no interviene en otras reacciones fácilmente. Por esta razón, la mircetina, quercetina y kempferol son barredores de radicales muy eficientes por sus grupos hidroxilo en el anillo B (figura 5). Asimismo, la ubicación de los dobles enlaces les permite la deslocalización de electrones entre los anillos y aumenta su potencial antioxidante. La catequina, en su forma aglicona, no es un buen barredor de radicales, posiblemente por la falta del doble enlace entre C2 y C3 y la ausencia del grupo oxo en el carbón 4 del anillo C (9,49,71,72,86,92,94). En medios lipofílicos, se puede hacer la misma analogía en cuanto al mayor potencial antioxidante en presencia de mayor número de hidroxilaciones en posiciones clave, sin embargo, no parece suceder lo mismo con la cantidad y posición de dobles enlaces en los anillos aromáticos (43,72).

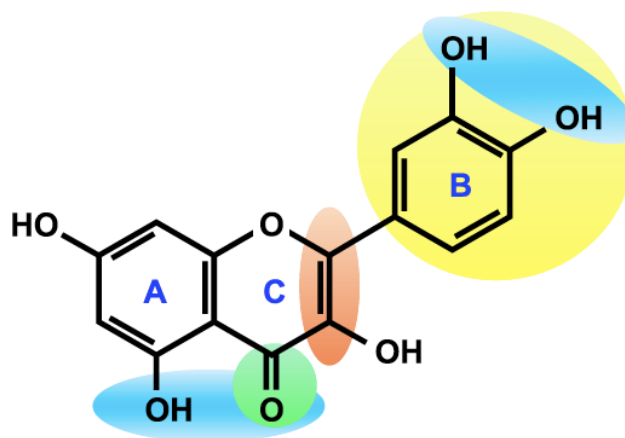


Figura 5. Relación estructura-actividad de la quercetina
Tomado de Williams *et al.* (2004) (94)

La capacidad prooxidante de estos compuestos viene determinada por la cantidad de hidroxilaciones de los anillos (60,95), la cantidad y tipo de metales presentes, el medio biológico en el que se dé la reacción y la concentración del flavonoide (76,96,97). Esta actividad prooxidante pareciera ser especialmente fuerte cuando el anillo B contiene grupos hidroxilo en los carbonos 3' y 4' (dihidroflavonoides), ya que se produce una oxidación del flavonoide que se une con macromoléculas en busca de electrones que lo estabilicen, lo que

podría resultar en la generación de especies reactivas al oxígeno, entre ellas un radical flavonoide fenoxilo (77,79). Esta actividad prooxidante puede ser inactivada por glicosilación de los anillos o la metilación de los grupos hidroxilo (98).

En cuanto a la capacidad antioxidante por grupos específicos de flavanoides, la quercetina es la que presenta mayor actividad, seguida de las antocianinas, los flavonones (naranjas y toronjas), flavonoles (cebollas, espinacas) y por último los hidroxicinamatos contenidos en frutas como la manzana, pera, melocotones y tomates (54). Específicamente, las antocianinas son un grupo extenso gracias a la gran diversidad de sustituciones metoxilo o hidroxilo en su estructura básica, la presencia y posición de distintos azúcares y la acetilación de estos ante diferentes ácidos orgánicos y agentes acetiladores (figura 6) (17,43,88–90). Según su estructura, actúan como agentes reductores o quelantes de metales, lo que les confiere el potencial para actuar como barredores de especies reactivas al oxígeno (23,94).

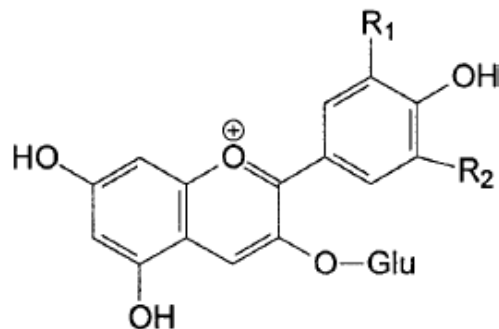


Figura 6. Estructura básica de las antocianinas
Tomado de Clifford (2000) (90)

Flavonoides y salud

Los flavonoides se han estudiado ampliamente debido a su utilidad en el procesamiento de alimentos, a sus características sensoriales y a su papel en la prevención del daño oxidativo causado por los ROS al ADN, a proteínas, a los lípidos y a otras macromoléculas (17,45,77,86,88,89).

Actualmente, el estudio y la identificación de antioxidantes presentes en productos naturales está experimentando un gran auge, ya que existen estudios que demuestran la importancia que tiene, en los seres humanos, la ingesta de este tipo de sustancias en la prevención de ciertos tipos de cáncer, el envejecimiento y otras patologías asociadas con estrés o daño oxidativo (2,34,41,91,99,100).

Estudios epidemiológicos han resaltado que el consumo de este tipo de compuestos reduce el riesgo de aparición de ciertas enfermedades, sobre todo las de origen cardiovascular, tumoral y neurodegenerativas, probablemente debido a sus diversas propiedades farmacológicas relacionadas con un aumento de la capacidad antioxidante del plasma luego de su consumo (9–12,54,101–103).

Enfermedades neurodegenerativas

Un número cada vez mayor de estudios epidemiológicos demuestra la eficacia de los polifenoles provenientes de las frutas y vegetales para reducir o impedir la muerte neuronal, probablemente por diversos mecanismos como: alteración de procesos de apoptosis o de síntesis, degradación de proteínas (como el péptido beta amiloide) y la protección contra la neurotoxicidad provocada por estrés oxidativo (45,49,104,105), entre otros. Esto representa una fuente de compuestos fitoquímicos a estudiar para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedades cardiovasculares

Algunos estudios clínicos y epidemiológicos relacionan el consumo de los flavonoides presentes en frutas, semillas, vegetales, vino tinto y otros alimentos con un efecto protector cardiovascular. Estos compuestos parecen disminuir la oxidación del LDL, modular la concentración de óxido nítrico, mejorar la función endotelial y el consumo de oxígeno por el miocardio; así como restaurar la contractibilidad cardíaca, entre otras acciones (12,54,57,62,73,91,102,103,106–111).

Los polifenoles como quercetina, rutina, hesperidina, catequina y las antocianinas han sido ampliamente estudiados por sus efectos en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Diversos estudios *in vitro* han determinado que los ácidos fenólicos, los taninos, estilbenos, lignanos, isoflavonas y los flavonoides presentes en frutas como granadas, frambuesas, naranjas, cerezas, fresas, uvas, moras, arándanos inhiben la peroxidación del LDL, aumentan niveles de HDL y modulan marcadores (entre ellos inflamatorios) importantes en la aparición y mantenimiento de la enfermedad cardiovascular (12,31,40,49,62,63,63,103,111,112).

El consumo de vino tinto se ha relacionado con una disminución en los episodios patológicos por enfermedades cardiovasculares, posiblemente por la gran cantidad de flavonoides que contiene como rutina, catequina, quercetina, epicatequina; y el resveratrol, ampliamente reconocido por sus propiedades en la prevención de las enfermedades cardiovasculares por su gran actividad antiinflamatoria (49,91). El consumo de cocoa y chocolate oscuro, soya, cítricos y bayas ha demostrado mejorar la función endotelial y disminuir la presión arterial, probablemente por el aumento en la producción de óxido nítrico causado por las catequinas e isoflavonas presentes en estos alimentos (45,103). La administración de quercetina y epicatequina a voluntarios sanos ha demostrado aumentar la producción de óxido nítrico circulante en sangre y mejorar el metabolismo de lípidos (12,111).

Se ha comprobado que el consumo de té verde disminuye la circunferencia abdominal y el índice de masa corporal, altera el metabolismo lipídico, reduce la presión arterial, previene la agregación plaquetaria y favorece la fibrinólisis, disminuye el contenido de colesterol en las arterias y previene contra el daño causado por la liberación de óxido nítrico (12,86,112–114); contribuyendo en general a la disminución de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares.

Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con 9,6 millones de muertes reportadas en el 2018. Un tercio de estas muertes se debe al sobrepeso y la obesidad, a la falta de actividad física y al bajo consumo de frutas y vegetales, entre otros factores (40,115).

La asociación entre el consumo elevado de vegetales y frutas y la reducción en la aparición, propagación o progresión de ciertos tipos de cáncer (62,93,116), ha generado que las plantas comestibles se hayan venido considerando como fuente de drogas anticancerígenas, probablemente por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y otras actividades biológicas (77,79,117,118).

Distintos modelos animales y celulares han demostrado que los polifenoles, como las antocianinas y procianidinas, podrían tener una actividad citotóxica potencial en varios tipos de cáncer sin mayor alteración en células sanas. Esta actividad se podría atribuir a variedad de factores como: la estructura química y la concentración a la que se encuentren los polifenoles en el medio; a su interacción con metales pesados como el cobre o hierro en el medio en el que se encuentren, entre otros (42,45,60,78,87,93,119–122). Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado, en diferentes poblaciones, la relación positiva entre el consumo de flavonoides y la disminución en el riesgo de distintos tipos de cáncer, como el de seno, próstata, pulmón (93,123).

La actividad citotóxica de los polifenoles podría estar relacionada con diversos mecanismos de acción como: el arresto en el ciclo celular, la inhibición de la proliferación celular o la inhibición de la activación del sistema inmunológico (86,116), la inhibición de enzimas como: las quinasas directamente relacionadas con la activación de cierto tipo de cánceres y procesos inflamatorios (77,94); la fosfolipasa A2, las topoisomerasas (93) las ciclooxigenasas, la óxido nítrico sintasa y las lipooxigenasas relacionadas con procesos inflamatorios. También pueden inducir la síntesis de enzimas de fase II, las cuales favorecen la excreción de carcinógenos o sus metabolitos al conjugarlos con moléculas polares

endógenas (77,93). Los polifenoles también favorecen la proliferación de linfocitos NK, la síntesis de interferones (49,94), así como el aumento en la interacción con proteínas endógenas y la apoptosis (74,77,98,124).

La apoptosis es un mecanismo importante de muerte celular programada que ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, con el fin de mantener un balance entre la proliferación y la muerte celular y así prevenir el desarrollo de ciertas malignidades, como el cáncer (93,125). Es un proceso coordinado con cambios celulares característicos, en el que las células se encogen con todas sus organelas intactas; el núcleo y el citoplasma se fragmentan en los denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células circundantes normales o por macrófagos. No se observa inflamación ya que los componentes intracelulares no se liberan al tejido intersticial. Este proceso de apoptosis puede ocurrir por dos vías: la extrínseca y la intrínseca, tal y como se puede observar en la figura 7. La vía extrínseca se origina con la interacción entre una proteína de muerte celular (como por ejemplo FasL o TNF α) y los receptores de membrana de la familia del factor de necrosis tumoral, activando una serie de caspasas que causan la muerte celular. Por otra parte, la vía intrínseca no responde a la activación de receptores, sino que provoca una serie de eventos mitocondriales en respuesta a estímulos positivos o negativos. Entre los estímulos negativos se tiene la ausencia de hormonas o factores de crecimiento que normalmente preservan la célula de la muerte, activándose la apoptosis. Por el contrario, los estímulos positivos pueden ser la radiación, la hipoxia, las toxinas, las infecciones virales y los radicales libres que provocan que se desencadene la muerte programada. En esta vía, estos estímulos activan proteínas de la familia BCL-2 las cuales pueden comportarse como pro-apoptóticas o anti-apoptóticas, dependiendo de la situación. Cuando estas proteínas BCL-2 se comportan como pro-apoptóticas, se activan las BCL2 associated X protein (BAX) y las BCL2 antagonist killer 1 (BAK) que alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial y provocan la liberación de citocromo *c*, con la posterior activación de las caspasas. Las caspasas son enzimas que llevan a cabo la fase de ejecución de la apoptosis, degradando el material del núcleo y de las proteínas citoesqueléticas, lo que causa los cambios morfológicos característicos. La última fase de la apoptosis ocurre cuando se traslocan los fosfolípidos de

membrana exponiendo residuos de fosfatidilserina que permiten el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos u otras células circundantes (126).

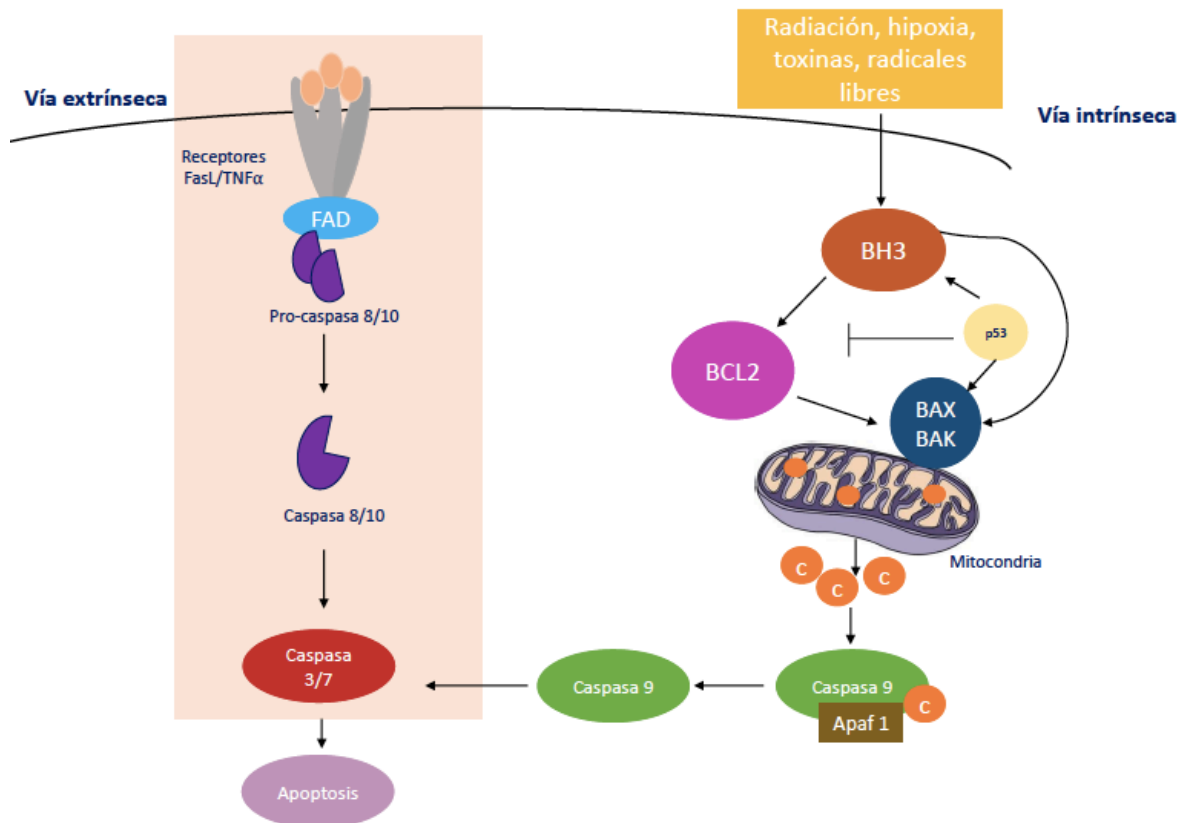


Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis
Modificado de Ichim y Tait (2016) (127)

En respuesta al estrés o condiciones adversas, la mitocondria produce una cantidad fisiológica de ROS para iniciar una respuesta endógena que permita a la célula deshacerse de ellos, mediante enzimas antioxidantes. Estos ROS pueden activar a las MAPK (figura 8), que a su vez reclutan otras proteínas citosólicas como JUN, FOS, Nrf2 y ERK1/2 hacia el núcleo, activando la transcripción de genes antioxidantes. Se ha reportado que las MAPK podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica de enzimas de fase II y la inducción de apoptosis mediada por polifenoles (figura 9) (74,77,87,128).

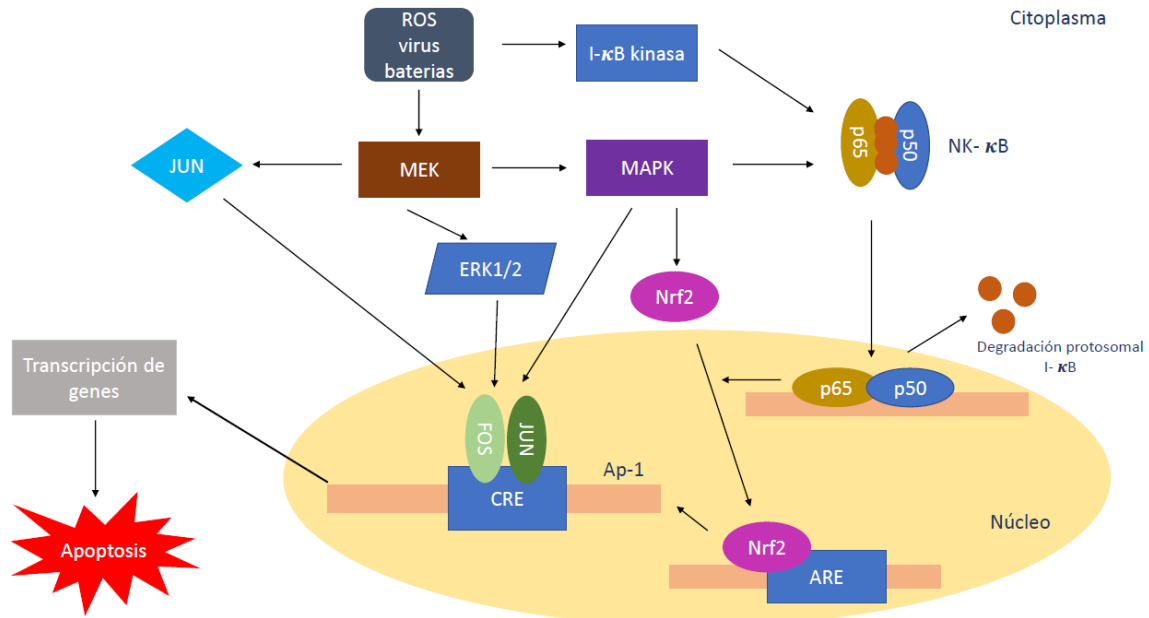


Figura 8. Relación entre las vías del factor de transcripción NF- κ B, MAPK y apoptosis
Modificado de Espinoza-Diez *et al.* (2015) (128)

Algunas enfermedades como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas son producto de anomalías en la regulación de los procesos de apoptosis. En el cáncer, la supresión de la apoptosis es fundamental para su progresión, la cual puede ocurrir al aumentar la expresión de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 o al provocar mutaciones o regulación a la baja de la expresión de proteínas pro-apoptóticas como BAX (126).

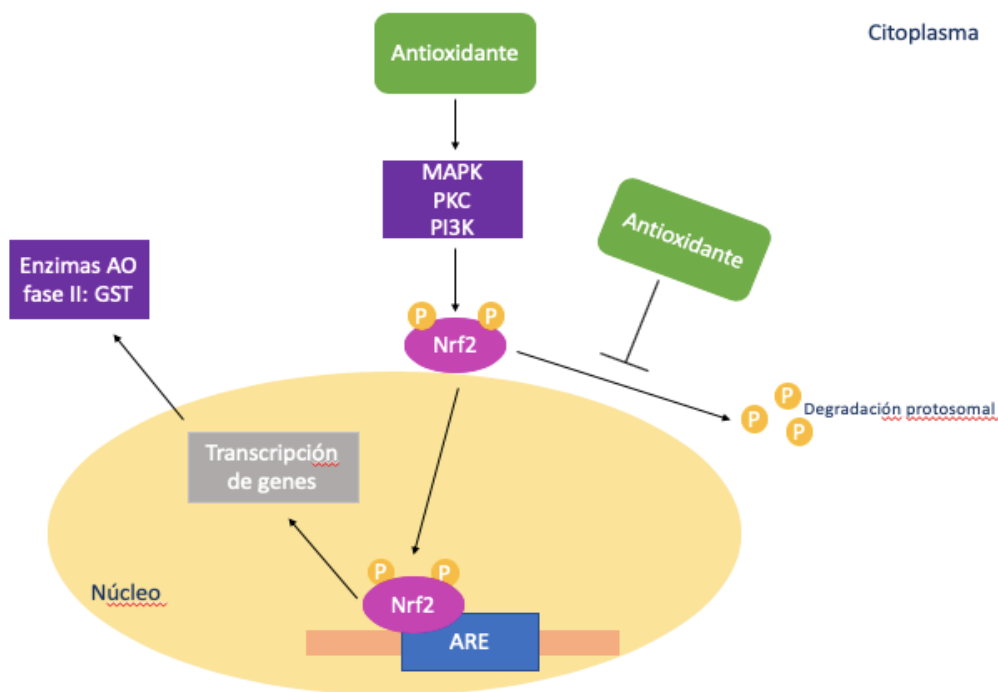


Figura 9. Relación entre las MAPK y la actividad de compuestos antioxidantes
Modificado de Finley *et al.* (2011) (30)

En procesos apoptóticos se observa un aumento en la generación y la regulación de las especies reactivas al oxígeno. Muchos compuestos naturales aumentan o disminuyen los niveles de ROS induciendo apoptosis en células cancerígenas (77,129). La quercetina puede inducir la producción de ROS y la consiguiente apoptosis de hepatomas y células leucémicas. La curcumina, al igual que la quercetina, induce apoptosis en una gran cantidad de células cancerígenas mediante la inducción de los ROS (129,130). Diversos estudios *in vitro* y algunos estudios epidemiológicos con té verde han demostrado la capacidad de algunos de sus polifenoles para inducir alteraciones mitocondriales que llevarían a la activación de los mecanismos apoptóticos y por ende su acción citotóxica. Por su parte, el licopeno pareciera inhibir el crecimiento de tumores de seno, próstata y pulmón; mientras que los elagitaninos presentes en la mora, fresas, frambuesas y otros alimentos, pueden inducir apoptosis de células cancerosas (86,98,130–134). Las fracciones ricas en antocianinas (delfinina, cianidina, pelargonidina) de diferentes fuentes como pétalos de flores, cáscara de uva y arroz rojo, maíz morado y distintos extractos de cerezas y otras bayas han demostrado actividad

anticancerígena a nivel del tracto gastrointestinal. Extractos ricos en antocianinas de frutos como la uva (*Vitis vinifera*), aronia (*Aronia melanocarpa*) y arándano (*Vaccinium myrtillus*) han demostrado actividad citotóxica *in vitro* contra el cáncer de colon, sin afectación de las células colónicas sanas (117).

Las camptotecinas, derivados naturales del árbol *Camptotheca acuminata* contienen antocianinas como la cianidina-3-O-galactósido y la cianidina-3-O-glucósido (135). Estos son compuestos inhiben la actividad de la topoisomerasa I y II, tanto *in vivo* como *in vitro*, con un amplio espectro de actividad en tumores sólidos, incluyendo linfomas, cánceres gástricos y colorrectales. Inhiben la proliferación o inducen apoptosis según la línea celular en la que se apliquen (136–139). Diversos autores han reportado que el uso de combinaciones de antocianinas con quimioterapias como 5-fluorouracilo (5-FU), plaquitaxel, trastuzumab, cisplatino, irinotecan y otros medicamentos, actúan sinérgicamente en la regulación de la actividad citotóxica y potencian los efectos de las terapias convencionales (87,140–142).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es bien conocido que el desarrollo y la severidad de muchas enfermedades se asocian con un estado fisiológico caracterizado por estrés o daño oxidativo (2,28). El aumento en la producción de radicales libres, junto con la disminución de las defensas antioxidantes del organismo provoca daño en macromoléculas, alteraciones en el metabolismo y en la fisiología normal (3,4). En situación normal, la producción de radicales libres es constantemente regulada y neutralizada por las defensas antioxidantes endógenas y exógenas (3,5,6).

Existen diferencias notorias entre individuos o grupos poblacionales con diferentes hábitos alimenticios, en la incidencia y prevalencia de ciertas enfermedades crónicas originadas por estrés oxidativo, especialmente aquellas de origen cardiovascular, neurodegenerativo, inflamatorio o tumoral (11,12). La identificación e incorporación de productos naturales con buena capacidad antioxidante en la dieta de las personas podría coadyuvar a prevenir este tipo de enfermedades (101,102).

La mayoría de los reportes de la capacidad antioxidante y propiedades biológicas proviene de alimentos que no son autóctonos de la región. Algunos de ellos no se consiguen para su consumo local y si se consiguen, han sido sometidos a métodos de recolección, almacenamiento y transporte que podrían alterar su perfil antioxidante y, por lo tanto, afectar su actividad biológica.

Son pocos los estudios que caracterizan fitoquímicamente las frutas costarricenses y muchos menos los que establecen las actividades biológicas de estas frutas. El güiscoyol (*Bactris guineensis*) es una fruta poco estudiada a nivel nacional e internacional. Datos del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) determinaron que la fruta fresca tiene un alto valor de ORAC y sería de esperar que tuviera una buena capacidad antioxidante y otras actividades biológicas, por lo que este trabajo pretende determinar la actividad antioxidante y posibles actividades biológicas de un extracto de polifenoles del güiscoyol costarricense.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad biológica de un extracto de polifenoles del fruto de güiscoyol (*Bactris guineensis*), mediante la evaluación de sus propiedades antioxidantes y su posible efecto citotóxico sobre líneas tumorales.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de compuestos bioactivos en el extracto de polifenoles del fruto de güiscoyol mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
2. Establecer la capacidad antioxidante de un extracto de polifenoles del fruto de güiscoyol, utilizando matrices biológicas y pruebas *in vitro*.
3. Evaluar el posible efecto citotóxico del extracto de polifenoles del güiscoyol, sobre líneas celulares tumorales.
4. Establecer un posible mecanismo de muerte celular del extracto de polifenoles del güiscoyol, sobre las líneas celulares tumorales.

METODOLOGÍA

Muestra

Recolección

Se recolectaron frutos maduros de *Bactris guineensis* en Santa Cruz, Guanacaste (10°17'03.2"N 85°34'19.0"W), durante el mes de mayo. A los frutos se les eliminó la semilla, se congeló la pulpa y cáscara a -80°C y posteriormente se liofilizó. El liofilizado se mantuvo a -80° C hasta la extracción de polifenoles.

Extracción de polifenoles

La extracción de polifenoles se realizó según el procedimiento de Mertz *et al.* (2007) (143). El fruto liofilizado (190,1 g) se extrajo tres veces por 30 min con un volumen final de 1250 mL de acetona al 70% (acetona/agua). Se filtró y se eliminó la acetona en rotavapor (40°C). El volumen resultante de la solución acuosa se pasó por una columna de Amberlita XAD-7 (150 mm x 20 mm) empacada con agua. Con el fin de eliminar los azúcares y otros compuestos la columna se lavó tres veces con agua destilada; finalmente los compuestos fenólicos fueron eluidos con metanol al 80% (metanol/agua). En el rotavapor se eliminó el metanol y posteriormente se liofilizó. La muestra se almacenó a -80°C hasta la realización de los análisis.

Cuantificación y caracterización de compuestos antioxidantes

La cuantificación de compuestos antioxidantes se realizó con la colaboración del laboratorio de química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Determinación del contenido de polifenoles

Diversos trabajos han establecido una buena correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales de alimentos analizados (41). Uno de los métodos más ampliamente utilizados para la medición de los polifenoles totales es el del reactivo Folin-Ciocalteu.

El contenido total de polifenoles se determinó según el ensayo de Folin-Ciocalteu modificado por Georgé *et al.* (2005) (145). Se agregó el reactivo Folin Ciocalteu (1:10 en agua) al extracto y luego de 2 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 2.0 mL de carbonato de sodio (75 g/L). La mezcla se calentó a 50°C por 15 min y se enfrió en baño de agua con hielo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro Pharmaspec UV-1700 Shimadzu (Japón). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto. Cada muestra se analizó por duplicado.

Determinación del contenido de antocianinas

El contenido total de antocianinas se determinó usando el método de pH diferencial para la cianidina-3-glucósido. Las antocianinas monoméricas sufren un cambio estructural reversible en función del pH. A un pH de 1.0 se transforman en un catión de color, mientras que a un pH de 4.5 se transforman en una base hemiacetal incolora. La diferencia de absorbancia a una longitud de onda cerca de 520 nm es proporcional a la concentración del pigmento (146).

Se midió la absorbancia del extracto a 510 nm a pH 1.0 y pH 4.5. El cálculo del contenido total de antocianinas se realizó usando el peso molecular de 449,2 g C3G/mol y el coeficiente de extinción molar de 26900 L/mol*cm de la cianidina-3-glucósido. Los resultados se expresaron en mg de cianidina-3-glucósido por gramo de extracto. Cada muestra se analizó por duplicado.

Caracterización de polifenoles por HPLC

Se hicieron dos caracterizaciones fitoquímicas del extracto de polifenoles del güiscoyol. La primera con la colaboración del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y la segunda con la ayuda del Departamento de Farmacia de la

Universidad de Salerno (Fisciano, Italia). Se separaron los compuestos por cromatografía de líquidos y se identificaron por espectrometría de masas.

Para la primera, el extracto de polifenoles fue analizado por UPLC (Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography) para antocianinas y polifenoles según los protocolos de Mertz *et al.* (2007) (143) y Gancel *et al.* (2011) (144). El UPLC está equipado con un detector de arreglo de diodos (ACQ- PDA) acoplado a un detector de masas ESI-Q-TOF/MS (*Electrospray Ionization*- voltaje capilar 2.3 kV, temperatura capilar 270 °C- y *Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Las masas fueron adquiridas en modo positivo, realizando un *scan* de m/z 50 a m/z 5000. La separación de la muestra se hizo con una columna C-18 Acquity UPLC CSH (Waters) (2.1mm x 100 mm, 1.7 μ m) con una pre-columna (2.1 mm, 0.2 μ m), usando como fase móvil ácido fórmico 0,1% (fase A); y acetonitrilo (fase B), ambos con ácido fórmico 0.1%. Con un gradiente lineal de: 0-2 min 98% A, 2-5 min 90% A, 5-8 min 85%, 8-14 min 85% A, 14-16 min 80% A, 16-18 min 50% A, 18-20 min 30% A, 20-26 min 10% A, 26-27 min 2%A; flujo de 0,4 mL/min a 30°C y 8 μ L del extracto rico en polifenoles.

Para la segunda caracterización, la presencia de proantocianidinas y glicósidos de antocianinas se determinó cuantificando las masas con un espectrofotómetro de masas LTQ OrbiTrap XL (ThermoFisher Scientific, Italia). Para el análisis cromatográfico se utilizó un sistema de UHPLC (Knauer, Labservice Analytica, Italia) equipado con un detector de arreglo de diodos, acoplado a un detector de masas ESI en modo negativo (voltaje capilar - 50 kV, temperatura capilar 300 °C), realizando un *scan* de m/z 150 a m/z 1500. Se utilizó una columna Kinetex (50 x 2.1, 2.6 micron, Phenomenex, Italia), usando como fase móvil agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), ambos con ácido fórmico al 0.1%. Con un gradiente lineal de: 0–10 min 2–20% B, 10–15 min 20–80% B, 15–16 min 80–98% B, 16–20 min 98% B; flujo de 0,5 mL/min a 30°C y 10 μ L del extracto rico en polifenoles.

Establecimiento de la actividad antioxidante

La cuantificación de la generación de radicales libres y especies reactivas al oxígeno, así como su captura, es importante para determinar el daño que provocan en los sistemas biológicos. Esta determinación se realiza por medio de métodos que evalúan la actividad barredora contra radicales libres en sistemas químicos y en matrices biológicas. En estas últimas, estos métodos cuantifican el grado en el que los antioxidantes las protegen del daño oxidativo

Determinación de la actividad barredora de radicales de nitrógeno (óxido nítrico)

El compuesto nitroprusiato de sodio (SNP, por sus siglas en inglés) genera óxido nítrico en presencia de luz. Debido a la inestabilidad del óxido nítrico, éste rápidamente se convierte en nitrito el cual puede ser cuantificado por medio de una reacción colorimétrica con el reactivo de Griess.

Para determinar la capacidad barredora de óxido nítrico del extracto rico en polifenoles se siguió el siguiente protocolo. En una placa de 96 pozos, de fondo plano, se colocaron 50 μL de diferentes concentraciones del extracto (50-1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se les agregó 50 μL de SNP (5mM). Se incubó por 1 h bajo luz directa de una lámpara para potenciar la producción de óxido nítrico. Posteriormente, se agregaron 100 μL del reactivo de Griess a cada pozo y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se prepararon los blancos de muestra agregando 50 μL de las diferentes concentraciones del extracto, 50 μL de agua destilada y 100 μL del reactivo de Griess.

Por aparte, a 100 μL de diferentes diluciones (3,1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de una solución de nitrito de sodio (10 mM) se le agregó 100 μL del reactivo de Griess, con el propósito de obtener una curva patrón de absorbancia vs. concentración de nitritos, a partir de la cual se puedan expresar las absorbancias obtenidas con el extracto y el SNP en concentración de nitritos.

La actividad barredora de óxido nítrico se reporta como la cantidad de extracto necesaria para reducir en un 50% la generación del óxido nítrico inducida por SNP (IC_{50}).

Cada concentración del extracto y cada blanco de muestra se preparó por triplicado; el experimento se realizó en 3 ocasiones independientes.

Determinación de la actividad barredora de radicales libres con DPPH

Según el método de Brand-Willams *et al.* (1995) (147), el 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) es un radical de color azul-violeta con un electrón desapareado, que se decolora hacia amarillo pálido al reaccionar con una sustancia antioxidante. Este cambio de color se puede determinar espectrofotométricamente.

A 1 mL de diferentes diluciones del extracto de polifenoles del güiscoyol en metanol (1,1-5,5 µg/mL) se le agregó 0,5 mL de una solución de DPPH (0,25 mM). Se preparó un tubo control (sin extracto) y un blanco de muestra por dilución para eliminar la interferencia del color del extracto en los cálculos de la determinación.

La mezcla se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 30 min. La absorbancia del DPPH se midió a una longitud de onda de 517 nm.

El porcentaje de la actividad barredora del radical (% RSA) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RSA} = [100 - (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{control}})] * 100$$

Se graficó el %RSA contra la concentración de la muestra para obtener una curva de regresión lineal y calcular el IC₅₀, expresando los resultados en µg/mL de extracto de güiscoyol, necesarios para obtener un 50% de actividad barredora de radicales libres. Cada concentración del extracto y cada blanco de muestra se preparó por triplicado; el experimento se realizó en 3 ocasiones independientes.

Determinación de la capacidad antioxidante por método ORAC

La técnica de ORAC mide la capacidad que tienen las sustancias de impedir o neutralizar el efecto de radicales libres sobre una sustancia fluorescente (fluoresceína). Como agente generador de radicales se utiliza el 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH, 250 mM).

Con el método ORAC se determina la capacidad antioxidante de una muestra, la cual se mide siguiendo la cinética de una reacción por medio de espectrofotometría de fluorescencia. En principio, se tiene una solución de fluoresceína que cuando está en contacto con radicales libres produce una disminución de la intensidad de fluorescencia. La muestra con poder antioxidante contrarresta el ataque del radical libre, protegiendo así la solución de fluoresceína. Este método utiliza una solución de Trolox como patrón antioxidante y como fuente de radicales libres utiliza el AAPH. Conforme aumenta la concentración del agente antioxidante (Trolox), la disminución de la intensidad de fluorescencia se retrasa, lo que demuestra que el Trolox cumple con su función de proteger a la fluoresceína. Esto se da porque el Trolox se oxida más fácilmente que la fluoresceína, donando el protón fenólico.

Se utilizó el procedimiento de Ou *et al.* (2002) (148). En placas de 96 pozos, negras opacas y de fondo plano, se colocaron 25 μL de dilución patrón de Trolox (12,5 -200 μM), PBS o la dilución en agua del extracto (5 mg/mL) y 150 μL de la solución de fluoresceína (10 nM). Se realiza una medida de fluorescencia basal (excitación 488 nm, emisión 520 nm) y luego de agregar automáticamente 25 μL de AAPH (240mM), se efectúa una lectura de la absorbancia con intervalos de 1 minuto por 45 min, con agitación leve 30 s antes de cada lectura.

Como el área bajo la curva (AUC) de la caída de fluorescencia es proporcional a la concentración de Trolox, se construye un gráfico AUC (Trolox) contra concentración de Trolox y se interpola la AUC de la muestra incógnita, obteniéndose de esta forma la actividad de la muestra en equivalentes de Trolox. Los resultados se expresan en micromoles de

equivalentes de Trolox (TE)/g de extracto. La muestra se analizó en tres repeticiones cada una por triplicado. Esta determinación se realizó con la colaboración del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Inhibición de ROS intracelular

La sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA, 10 μ M) es internalizada por difusión en las células y pierde su fluorescencia al ser desacetilada por esterasas intracelulares. En células tratadas con el agente oxidante hidroperóxido de tert-butilo (TBHP, 0,7 mM) se producen radicales libres de oxígeno (ROS) que oxidan al DCFDA, y lo transforman en 2'7'-difluoresceína (DCF), un compuesto altamente fluorescente que puede ser detectado mediante citometría de flujo.

La determinación de la inhibición de los ROS intracelulares por el extracto rico en polifenoles del güisoyol se realizó siguiendo la metodología de Azofeifa *et al.* (2015) (134). Una suspensión de la línea celular Vero (250 μ L; 5×10^5 células/mL) se cultivó en placas de 48 pozos. Se incubó por 5 h a 37° C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Luego de agregar distintas concentraciones del extracto rico en polifenoles (7,5-250 μ g/mL), se incubó nuevamente a 37° C, 5% de CO₂ durante 20 h. Posteriormente, se eliminó el extracto mediante dos lavados con 1 mL de solución salina de buffer de fosfatos (PBS), y se sometieron las células a un reto oxidativo con 4,2 μ L TBHP (50 mM) por 2 h. Treinta minutos antes de finalizar el tiempo del reto oxidativo se agregaron 300 μ L de la sonda DCFDA (5 μ M concentración final) a las células. Luego, se lavaron las células dos veces con 1 mL de PBS, se agregaron 250 μ L de tripsina-EDTA (0,1%, 2,5 mM EDTA), se incubó por 5 min con el fin de despegar las células; finalmente se agregaron 250 μ L de medio de cultivo suplementado con suero fetal al 10% y 1 μ L de yoduro de propidio (1 mg/mL) para trabajar con las células vivas. Se midió la fluorescencia en el citómetro de flujo a 10.000 células vivas (FACScalibur, Becton-Dickinson). Se realizaron dos controles con células

Vero sin tratamiento de extracto: a) con inducción en la producción de ROS (con TBHP) y b) sin inducción de ROS (sin TBHP), esto con el fin de calibrar la medición.

Para el análisis de las poblaciones obtenidas se utilizó el programa Cell Quest. Se graficó el % de células positivas para DCF contra la concentración del extracto para obtener una curva a partir de la cual se calculó el IC₅₀. Los resultados se expresaron en µg/mL de extracto de güiscoyol necesarios para obtener un 50% de disminución de las células DFC positivas por acción del ROS. Por tanto, a menor valor de IC₅₀ mayor es la actividad inhibidora del extracto sobre los ROS producidos. El análisis se realizó en tres experimentos independientes. En cada experimento, las diferentes concentraciones del EPG se analizaron por duplicado.

Evaluación de la actividad protectora de la peroxidación lipídica

La cuantificación del grado de inhibición de los antioxidantes sobre el proceso del estrés oxidativo se ha medido en términos de la peroxidación lipídica de los sistemas biológicos, como una de varias técnicas disponibles. Se han desarrollado diversos métodos que permiten tal cuantificación, entre ellos: el método *Erythrocyte Cellular Antioxidant Activity* (ERYCA), utilizado para medir la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos puros, de extractos y jugos de frutas; y la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Determinación de la capacidad antioxidante celular por el método ERYCA

Este método, descrito por González *et al.* (2010) (149), realiza una determinación de la actividad antioxidante con base en la capacidad de los eritrocitos humanos intactos y hemolisados para desviar la luz. Se utiliza el AAPH para inducir la peroxidación lipídica de la membrana de los eritrocitos, con la consecuente hemólisis, lo cual causa la disminución en la absorción de la luz a 700 nm. El área bajo la curva (AUC) resultante refleja la capacidad antioxidante del extracto evaluado.

Se colocaron 50 μL de una suspensión de eritrocitos humanos al 2%, lavados en PBS, en placas de 96 pozos de fondo plano. Se agregaron 100 μL de diferentes diluciones del extracto de polifenoles (1,5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ó 100 μL de una curva patrón de quercetina (2,5-40 μM). Se agregaron 100 μL de AAPH a cada pozo y se colocó la placa en el Cytation 3 (BioTek Instruments, USA) para las lecturas a 700 nm, a 37° C. Las lecturas de la absorbancia se hicieron cada 5 min durante 6 h, con agitación leve 30 s antes de cada lectura.

El efecto protector del extracto rico en polifenoles se midió mediante el área bajo la curva (AUC) de la muestra y su comparación con el AUC de la quercetina. Los resultados se expresan en milimoles de equivalentes de quercetina por gramo de extracto. La muestra se analizó en tres experimentos independientes y cada una de las muestras se evaluó por triplicado.

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogenizados de hígado de rata

La presencia de malonaldehído (MDA), un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados es un buen estimado general de la peroxidación lipídica en matrices diversas. El MDA se forma por la oxidación y la degradación enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados, liberando productos secundarios que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), dando un compuesto rojizo que tiene una absorbancia máxima a los 532 nm. Como matriz lipídica se utilizó un homogenizado de hígado de rata al 20% en PBS.

El siguiente procedimiento fue aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuido de los Animales (CICUA N° 036-15). Los animales fueron traídos del Bioterio el día que se usó el hígado y fueron sacrificados por decapitación, ese mismo día. Se decapitaron cinco ratas Sprague-Dawley con un peso aproximado de 250 g, anestesiadas previamente con CO_2 . Se les extrajo 5 g de hígado, el cual fue homogenizado en 20 mL de solución PBS con un Ultraturrax T-25 (Ika-Labortechnik, Alemania). La suspensión se centrifugó a 9000 \times g durante 15 min a 4° C para reducir los sólidos suspendidos. A 0,75 mL del homogenizado

de hígado se le agregaron 75 μL de diferentes concentraciones del extracto rico en polifenoles (2,67-171 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se incubaron a 37° C por 30 min. Se indujo el estrés oxidativo con 50 μL de hidroperóxido de *tert*-butilo (TBHP) a una concentración final de 1,7 nM y se incubó a 37° C por 1 h. Finalmente, se miden los TBARS como productos finales de la peroxidación lipídica según el procedimiento de Uchiyama & Mihara (1978) (150). Se mezclaron 0,25 mL de homogenizado de hígado con 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 35 %, y 0,25 mL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) y se incubó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0,5 mL de TBA al 0,75 % y se calentó en un baño a ebullición por 45 min. Luego de dejar enfriar los tubos, se agregaron 0,5 mL de TCA al 70 %, se agitó y se centrifugó a 2500 $\times g$ por 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm. La concentración de TBARS se determinó usando el coeficiente de absorción molar de MDA ($1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) y los resultados se expresaron en nmol MDA/g de hígado. Se graficó la cantidad de MDA (nmol/g de hígado) contra la concentración de la muestra, estableciéndose una curva para calcular la IC_{50} . Para determinar el nivel basal de peroxidación lipídica, se midió la concentración de MDA sin TBHP en todas las muestras de homogenizados de hígado. Como blancos de muestra para corregir el color propio del extracto, se prepararon tubos con el mismo protocolo detallado anteriormente, pero utilizando PBS en sustitución del homogenizado de hígado. Cada dilución y el control se analizaron en homogenizados de 5 ratas y se repitió en 3 experimentos independientes.

Determinación de la actividad citotóxica

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: Vero, línea no tumoral proveniente de riñón de mono; SW620, células de adenocarcinoma humano de colon y AGS, células de carcinoma gástrico humano. Las líneas celulares se mantuvieron en medio esencial Dulbecco, suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina 2 mmol/L, penicilina 100 IU/mL, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ y anfotericina B 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, se mantuvieron en incubadora humidificada a 37°C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%.

Determinación del efecto citotóxico del EPG sobre líneas celulares tumorales

Se determinó el efecto del extracto de polifenoles del *B. guineensis* sobre la viabilidad de las líneas celulares Vero (control), AGS y SW620, utilizando el ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolin bromuro (MTT). Este ensayo se fundamenta en que la enzima isocitrato deshidrogenasa, presente en la membrana interna de la mitocondria de las células vivas, reduce el MTT a cristales de formazán, un compuesto de color azul cuya absorbancia se puede medir a 570 nm.

En una placa de 96 pozos, fondo plano, se agregaron 100 μ L de una suspensión de células (2×10^5 células/mL); 18-20 h más tarde se retiraron 50 μ L de cada pozo y se agregaron 50 μ L de diferentes concentraciones del extracto rico en polifenoles (1,95-500 μ g/mL) y se dejaron pozos control con solo medio de cultivo. Posteriormente, la placa se incubó por 48 h a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Luego se eliminó el medio de cultivo y se lavó cada pozo dos veces con 100 μ L de PBS. Seguidamente se agregaron 100 μ L de medio de cultivo con MTT (5 mg/mL) y se incubó durante 2 h a 37°C. Bajo una atmósfera de CO₂ al 5%, se removió cuidadosamente el medio de cultivo y se agregó 100 μ L de etanol al 95 % para disolver los cristales de formazán. Se leyó la absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresaron en % de viabilidad, utilizando como control la absorbancia de las células que crecen en ausencia del extracto, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{control}}) * 100$$

Se graficó el porcentaje (%) de viabilidad contra la concentración de la muestra, estableciéndose una curva para calcular la IC₅₀. La muestra se analizó en tres experimentos independientes y en cada uno se evaluó por triplicado.

Con el fin de determinar la selectividad del EPG hacia las líneas celulares AGS y SW620, se calculó el índice de selectividad (IS) de la siguiente manera:

$$\text{IS} = \text{IC}_{50} \text{ células control no tumoral (Vero)} / \text{IC}_{50} \text{ células tumorales}$$

Determinación del posible mecanismo de muerte celular del EPG sobre la línea celular de adenocarcinoma SW620

Se usó la línea celular SW620, dado que sobre esta línea celular se observó el mayor efecto citotóxico. Se determinó la capacidad del extracto rico en polifenoles para favorecer la muerte celular mediada por apoptosis en la línea SW620. Se utilizó el kit comercial con yoduro de propidio y la anexina V conjugada con Alexa Fluor® (Life Technologies) como marcadores de las células muertas y de apoptosis, respectivamente.

El yoduro de propidio (PI) es un compuesto fluorogénico que ingresa únicamente cuando la célula tiene su membrana comprometida y está muerta. La anexina (A) se une al fosfolípido fosfatidilserina, el cual, en circunstancias normales, se encuentra en el lado citoplasmático de la membrana celular. Cuando las células entran en apoptosis, este fosfolípido migra hacia el lado extracelular donde puede reaccionar con la anexina.

Este método se realizó de acuerdo con lo descrito por Liu *et al.* (2010) (151) con algunas modificaciones. Brevemente, se cultivó 1 mL de suspensión de la línea celular SW620 (3×10^5 células/mL) en una placa de 6 pozos por 24 h a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%, luego se agregó 1 mL de distintas concentraciones (5, 10 y 20 µg/mL) del extracto rico en polifenoles y se incubó durante 48 h. Después de este tiempo, las células se tripsinizaron y la suspensión celular se centrifugó por 5 min a 300 x g; se lavó con 1 mL de PBS, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µL de buffer de unión a anexina. Luego se realizó la tinción con 1 µL de PI (100 µg/mL). Se incubó, protegido de la luz, durante 15 min, luego se agregaron 400 µL de buffer de anexina y se analizaron las células en el citómetro de flujo, determinando la fluorescencia a 530 nm y a 575 nm empleando 488 nm de excitación. Para cada análisis se analizaron 10,000 eventos. Como control positivo se utilizó 1 mL del medicamento camptotecina (10 µM) y como control negativo las células sin tratamiento.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Graphpad prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA). Para el análisis de los datos del ensayo de apoptosis se usó el programa Flowjo versión 7.6.1 (Tree Star, Inc.).

Para el análisis de los datos, según las diferentes metodologías, se usó un ANOVA de una vía, seguido de un análisis Tukey *post hoc*. En algunos casos se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

RESULTADOS

Caracterización del extracto en polifenoles

La cantidad de antocianinas y polifenoles totales presentes en el extracto se puede observar en el cuadro 1. Con el fin de tener una aproximación del tipo de compuestos antioxidantes presentes en el extracto de polifenoles del güisoyol (EPG), se hizo una caracterización de los polifenoles por UPLC y espectrometría de masas, como se puede observar en los cuadros 2 y 3, respectivamente.

Cuadro 1. Contenido de polifenoles totales y antocianinas en el EPG

Análisis	Contenido
Polifenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico/g extracto)	551,3 ± 16,1
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g extracto)	438,3 ± 8,3

Cada valor es el promedio ± ES de dos repeticiones independientes

Cuadro 2. Identificación de flavanoides presentes en el EPG por espectrometría de masas

TR UV	UV	TR Ms	MS	Identificación
		7,15	485,1600	Desconocido
7,19	203, 279, 519	7,18	595,1487	Cianidina 3- rutinósido
		7,26	595,1487	Cianidina 3- rutinósido
		7,41	595,1487	Cianidina 3- rutinósido
7,62	202, 219, 279	7,66	579,1418	Procianidina B1
8,14	200, 280	8,16	501,1610	Desconocido
8,46	202, 219, 279	8,38	675,1909	Desconocido
8,46	202, 219, 279	8,5	579,1569	Procianidina B1
8,46	202, 219, 279	8,65	475,1342	Desconocido
8,95	202, 219, 279	9	609,1822	Quercetina 3-rutinósido
9,4	201,275 475	9,47	325,0635	Desconocido
	202, 219, 279	9,74	635,1709	Desconocido
	202, 219, 279	10,3	601,1381	Desconocido
	202, 219, 279	11,44	675,1963	Desconocido
	202, 219, 279	12,05	595,1431	Desconocido
	202, 219, 279	12,54	579,1487	Procianidina B1

Cuadro 3. Identificación de flavanoides presentes en el EPG por espectrometría de masas

TR UV	TR MS	MS	Identificación
3,50	3,55	577,1319	eCat-eCat
3,60	3,65	289,0707	Cat
4,00	4,08	865,1945	eCat-eCat-eCat
4,33	4,37	1153,2564	eCat-eCat-eCat-eCat
4,70	4,76	577,1343	eCat-eCat
4,99	4,99	577,1324	eCat-eCat
5,15	5,19	289,0706	eCat
5,70	5,73	593,1488	Cianidina-3-O-rutinósido
6,10	6,16	865,1927	eCat-eCat-eCat
6,37	6,40	865,1942	eCat-eCat-eCat
6,70	6,76	577,1328	eCat-eCat
8,20	8,24	609,1432	Quercetina-3-O-rutinósido
8,38	8,42	577,1344	eCat-eCat
8,40	8,42	447,0925	Cianidina-3-O-glucósido

Cat (catequina); eCat (epicatequina); eCat-eCat (procianidina B dímero); eCat-eCat-eCat (procianidina B trímero); eCat-eCat-eCat-eCat (procianidina B tetrámero)

Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del EPG se midió mediante la determinación de su actividad barredora de radicales libres por tres métodos físicoquímicos y uno *in vitro* en una matriz celular.

Determinación del efecto barredor de NO

En cuanto al efecto “barredor” de óxido nítrico, en la figura 10 se muestra que al aumentar la concentración de EPG se produce una disminución significativa de la concentración de nitritos detectados con respecto al control.

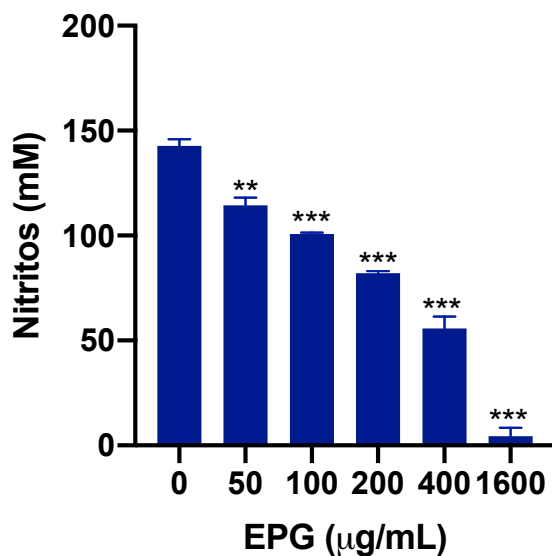


Figura 10. Actividad barredora del EPG sobre el óxido nítrico.

Cada valor es el promedio \pm ES de tres repeticiones independientes cada una por triplicado (** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$ con respecto al control; coeficiente de Pearson = -0.9082)

Actividad barredora de radicales por el método DPPH

En la figura 11 se puede observar una correlación positiva entre la concentración del EPG y su actividad barredora de radicales libres, medida por el método DPPH.

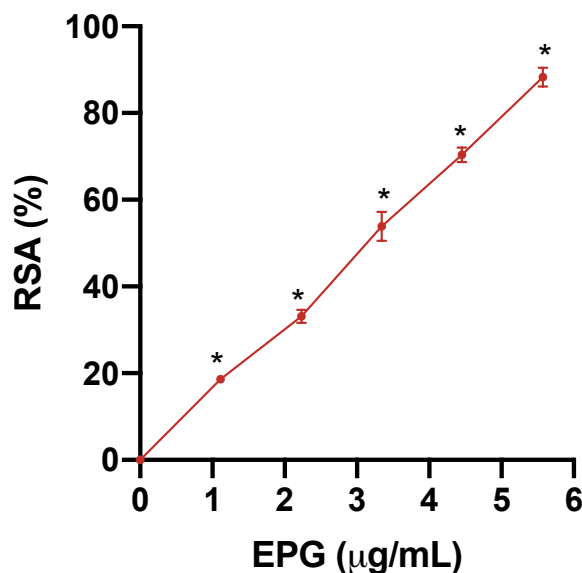


Figura 11. Actividad barredora del EPG sobre el radical DPPH.

Cada valor es el promedio \pm ES de tres repeticiones independientes cada una por triplicado (* $p < 0.0001$ con respecto al control; r Pearson=0.9991)

Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC

En el cuadro 4 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del EPG, determinada mediante el método ORAC y comparada con los dos primeros métodos fisicoquímicos. También se incluyen los valores de dos patrones comerciales para las tres pruebas.

Cuadro 4. Actividad antioxidante del EPG por tres métodos fisicoquímicos *in vitro*.

	ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$)	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	NO IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EPG	9791 ± 390^a	$3,3 \pm 0,2^a$	324 ± 11^a
Quercetina	13410 ± 376^b	$2,1 \pm 0,1^b$	$19,4 \pm 1,3^b$
Catequina	22022 ± 132^c	$4,2 \pm 0,1^c$	604 ± 21^c

Cada valor representa el promedio con su error estándar. Se realizaron 3 repeticiones, cada una por triplicado. Los promedios por columna seguidos de letras distintas mostraron diferencias significativas ($p < 0.0005$).

En comparación con la quercetina o catequina, el EPG presenta una actividad más baja neutralizando el radical AAPH por el método ORAC, mientras que muestra una actividad intermedia entre estos dos patrones neutralizando el radical DPPH (quercetina>EPG>catequina).

Por otro lado, el extracto presenta poca actividad para secuestrar el óxido nítrico producido, en comparación con los controles quercetina y catequina.

Efecto inhibitorio del EPG sobre los ROS

Como forma de medir la inhibición de radicales libres intracelulares (ROS), se utilizó la sonda fluorescente DCFDA. Dentro de las células, esta sonda pierde su fluorescencia al ser desacetilada por esterasas intracelulares. En células tratadas con el TBHP, los ROS producidos oxidan al DCFDA y lo transforman en 2'7'-difluoresceína (DCF+), un compuesto altamente fluorescente. Por tanto, a menor valor de IC₅₀ mayor es la actividad inhibidora del extracto sobre los ROS producidos. Como se puede observar en la figura 12, a mayor concentración del EPG menor es la cantidad de células DFC+.

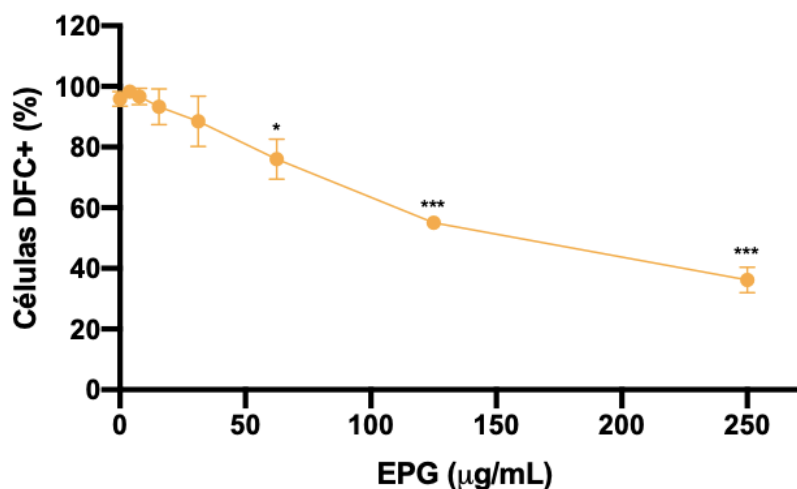


Figura 12. Efecto protector del EPG de la acción de ROS intracelulares en células Vero. Cada valor es el promedio \pm ES de tres repeticiones independientes (** $p < 0.0001$; * $p < 0.005$ con respecto al control; r Pearson = -0.9814)

La concentración necesaria del EPG para obtener una disminución del 50% de células DFC+ por acción de ROS es de 153 ± 13 µg/mL.

Evaluación de la actividad protectora de la peroxidación lipídica

Se evaluó la capacidad de distintas concentraciones del EPG para inhibir la peroxidación lipídica en dos matrices biológicas: eritrocitos humanos y homogenizados de hígados de rata.

Efecto protector sobre peroxidación lipídica por el método ERYCA

En la figura 13 se observa el efecto protector de diferentes concentraciones de EPG sobre la integridad de la membrana de eritrocitos humanos. Tal y como se observa, a una concentración de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ el EPG logró inhibir la hemólisis de eritrocitos de forma similar a la inhibición que produce la quercetina a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$ (40 μM).

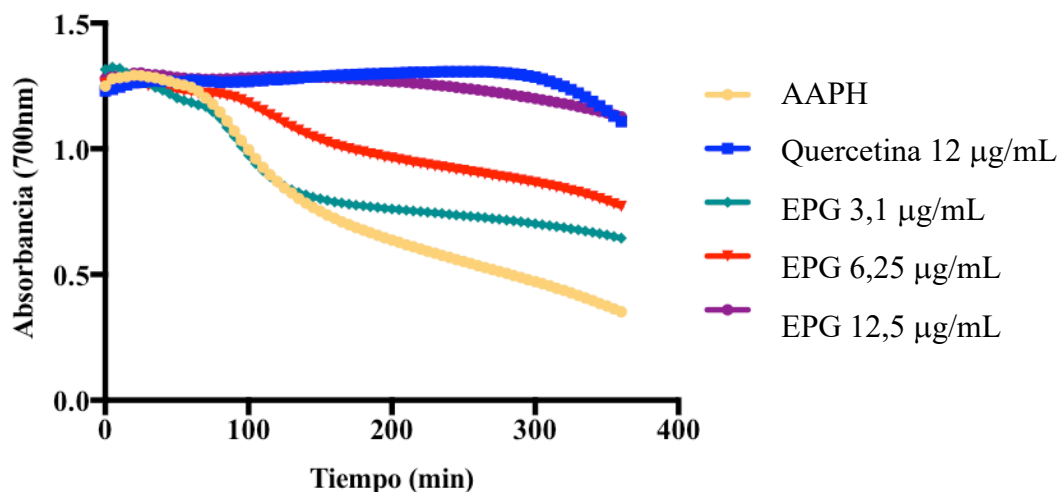


Figura 13. Efecto protector del EPG contra la peroxidación lipídica en eritrocitos
Cada valor es el promedio \pm ES de tres experimentos independientes

La capacidad inhibitoria del EPG fue de $3,65 \pm 0,15$ mmol de QE/g (equivalentes de quercetina por gramo de extracto).

Determinación de la inhibición de la producción de MDA

Al medir el efecto inhibitorio sobre la peroxidación lipídica en homogenizados de hígado de rata, se puede observar una disminución en el malondialdehído (MDA) producido, al aumentar la concentración del EPG (figura 14).

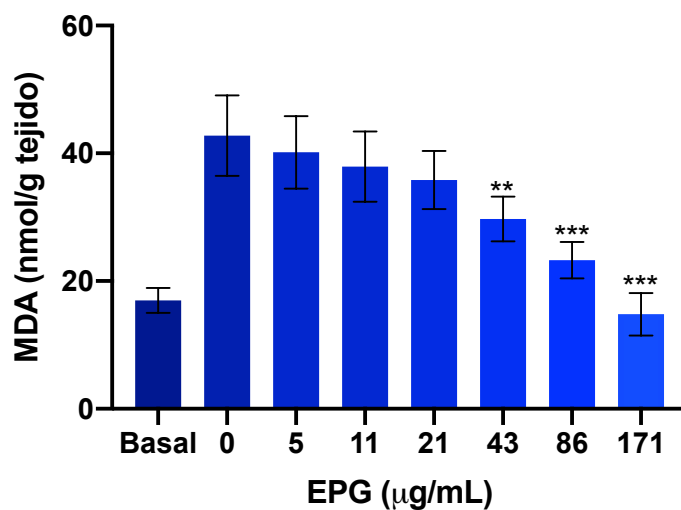


Figura 14. Efecto protector del EPG contra la peroxidación lipídica en homogenizados de hígado de rata.

Cada valor es el promedio \pm ES de tres repeticiones independientes (** $p < 0.0001$; ** $p < 0.005$ con respecto al control)

La concentración necesaria para disminuir al 50% la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (reportado como concentración de MDA) en homogenizados de hígado de rata es de $52,8 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$.

Determinación de la actividad citotóxica

Determinación del efecto citotóxico del EPG sobre líneas celulares tumorales

Se evaluó el efecto de varias concentraciones del EPG sobre la viabilidad de dos líneas celulares tumorales del sistema gastrointestinal y una línea celular de riñón de mono Vero, como control no tumoral, mediante el ensayo con MTT.

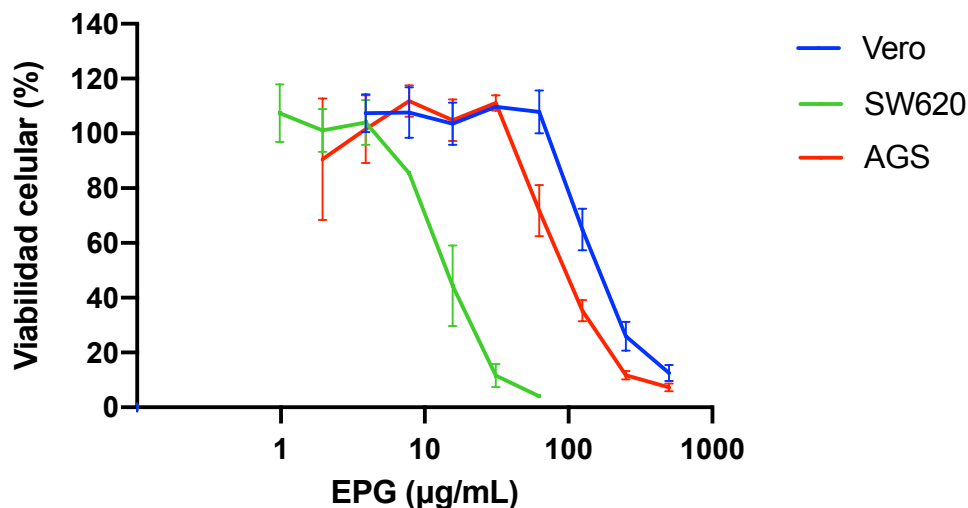


Figura 15. Efecto del EPG sobre la viabilidad de tres líneas celulares.

Cada valor es el promedio \pm ES de tres experimentos independientes.

En la figura 15 se observa una reducción en la viabilidad celular al tratar las tres líneas celulares con diferentes concentraciones del EPG. Para las células de adenocarcinoma de colon (SW620) se obtuvo una IC₅₀ de $16,2 \pm 1,5$ µg/mL, un valor significativamente más bajo que el que se observó para las células Vero ($175,8 \pm 16,4$ µg/mL). Para las células de adenocarcinoma gástrico (AGS) se obtuvo un valor de IC₅₀ de $113,6 \pm 2,4$ µg/mL (figura 16).

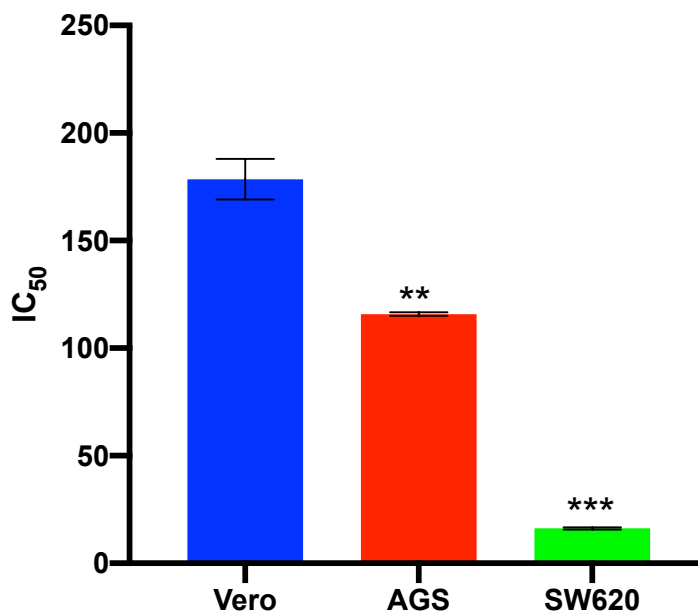


Figura 16. Valores de IC₅₀ del EPG en tres líneas celulares.

Cada valor es el promedio \pm ES de tres experimentos independientes para cada línea celular (**p=0.003; ***p<0.0001 con respecto al control no tumoral Vero).

Se determinó el índice de selectividad (IS) del extracto, ya que un IS igual o superior a 2 implica que el compuesto o extracto es dos veces más citotóxico en las líneas tumorales que en líneas normales e igual o mayor a tres se considera un compuesto o extracto con potencial terapéutico (152,153). El extracto presentó un índice de selectividad de 10,8 para las células SW620 y de 1,54 para las células AGS.

Determinación del posible mecanismo de muerte celular del EPG sobre la línea celular de adenocarcinoma SW620

Se utilizó el ensayo con anexina V/yoduro de propidio para determinar si la citotoxicidad observada en las células de adenocarcinoma de colon se atribuía a un proceso de apoptosis o necrosis.

En la figura 17 se observan los resultados de la tinción de anexina V/yoduro de propidio en células SW620 expuestas a diversas concentraciones del EPG y camptotecina como control positivo. Luego de 48 h, se observa que el 51% de las células tratadas con el EPG se encuentran en apoptosis temprana y un 18% en apoptosis tardía (figura 17 B), en comparación con las células no tratadas (figura 17 A). Las células tratadas con el control

positivo, camptotecina, se observan mayoritariamente en apoptosis temprana y apoptosis tardía, según la figura 17 C. De estos resultados, se puede observar que ambos disminuyen la viabilidad celular por apoptosis y no por necrosis, según se desprende la figura 17D.

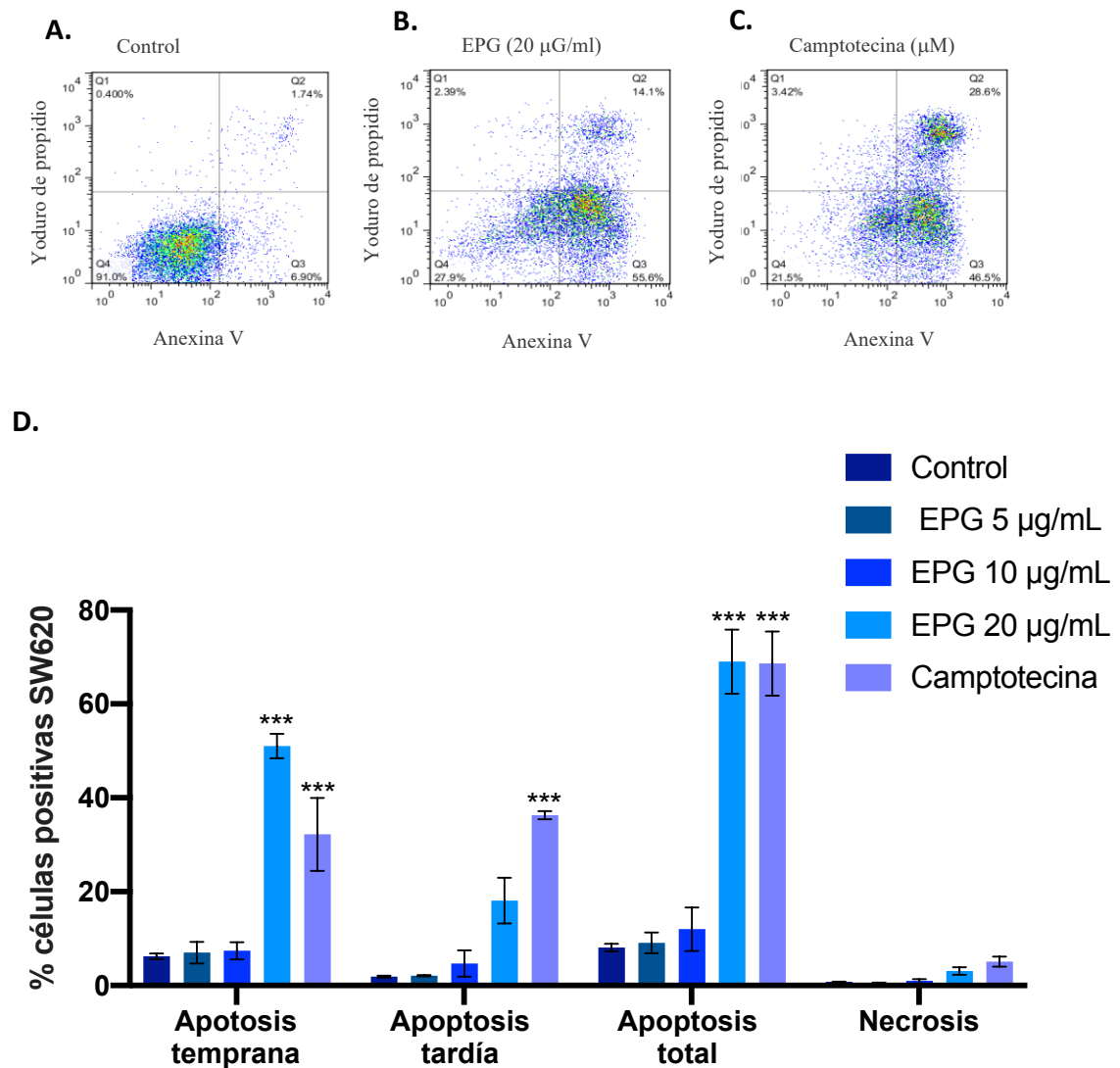


Figura 17. Efecto apoptótico del EPG y la camptotecina en la línea celular SW620. Cada valor es el promedio \pm ES de tres repeticiones independientes (***) $p < 0.0001$ con respecto al control).

DISCUSIÓN

Valoraciones preliminares del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) determinaron que la fruta fresca del güisoyol tiene un alto valor de ORAC, lo que podría ser indicativo de una buena capacidad antioxidante. En este trabajo se obtuvo un extracto de polifenoles del güisoyol (EPG) al cual se le determinó la cantidad de polifenoles y antocianinas totales, se le hizo una caracterización fitoquímica y se le determinó la actividad biológica, mediante la evaluación de sus propiedades antioxidantes y su posible efecto citotóxico sobre líneas tumorales.

Los polifenoles son compuestos bioactivos de gran interés por sus potenciales efectos en la disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y el cáncer. La mayoría de estos efectos se deben a las propiedades antioxidantes de los flavonoides presentes en los alimentos como frutas, vegetales, nueces, entre otros (59,154–156).

Para la extracción de los polifenoles de diferentes frutas y vegetales, la literatura reporta el uso de resinas macroporosas por su relativo bajo costo, fácil regeneración, buen porcentaje de recuperación de compuestos y la buena pureza de los extractos en su contenido de antocianinas (156,157). Para la obtención del EPG se utilizó la resina XAD-7, compuesta del polímero etilenglicol dimetil acrilato, empacada con agua que permitió remover los compuestos más polares y los azúcares (17,158,159). Para eluir los polifenoles se utilizó una mezcla de metanol-agua.

Al EPG se le determinó el contenido de polifenoles totales y de antocianinas, ya que en muchos estudios estos dos parámetros se correlacionan con la actividad antioxidante de frutas y otros alimentos (7,41,160,161).

El EPG muestra un alto contenido en polifenoles totales en comparación con los valores reportados por otros autores, superado solamente por la mora costarricense y la uva Tempranillo. Azofeifa *et al.* (2015) (134) reportaron una cantidad de polifenoles entre 679 y 714 mg GAE/g de extracto de mora, variedad “vino con espinas” obtenido con el mismo procedimiento utilizado para extraer los polifenoles del güiscol. Wang *et al.* (2011) (162) trabajaron con varios extractos de polifenoles eluidos mediante la resina Amberlita XAD-7 y determinaron la cantidad de polifenoles totales de varias frutas: 440 mg de GAE/g de extracto de mora, 400 mg de GAE/g de extracto de fresa, 540 mg de GAE/g de extracto de arándanos, 380 mg de GAE/g de extracto de frambuesas, 420 mg de GAE/g de extracto de arándanos rojos y 570 mg de GAE/g de extracto de la uva Tempranillo.

En cuanto a la cantidad de antocianinas, Osorio *et al.* (2010) (17) reportaron para el *Bactris guineensis* colombiano una cantidad de antocianinas que oscila entre 0,85-1,48 mg C3G/g de fruta, según varios tipos de extracción que realizaron (17). La diferencia con lo reportado para el güiscol costarricense podría radicar en la diferencia en la forma de expresión de la cantidad de antocianinas en ambos estudios. Azofeifa *et al.* (2015) (134) reportaron un contenido de antocianinas para un extracto de polifenoles de mora entre 181-195 mg C3G/g extracto. Wang *et al.* (2011) (162) reportaron un contenido de antocianinas para un extracto de polifenoles de la mora de 163,5 mg de C3G/g de extracto. Ese mismo estudio reportó valores de 153,5 mg de C3G/g de extracto de arándanos, 51,9 mg de C3G/g de extracto de arándanos rojos, 43,2 mg de C3G/g de extracto de fresa, 23,6 mg de C3G/g de extracto de la uva Tempranillo y 20,9 mg de C3G/g de extracto de frambuesas. El EPG muestra un alto contenido en antocianinas en comparación con los valores reportados para todas las frutas mencionadas.

Con el fin de caracterizar los polifenoles en el extracto obtenido, se hizo una caracterización fitoquímica mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas, dos de los métodos más empleados en identificación y cuantificación de polifenoles (157,163,164). Por medio de UPLC/UHPLC acoplado a masas, se determinó que el extracto del güiscol recolectado en Guanacaste presenta un perfil de polifenoles similares al de la

familia de las bayas. Contiene una mezcla de flavonoides, específicamente flavanoles, antocianinas y flavonoles. La composición muestra monómeros de catequina y epicatequina que se agregan en dímeros trímeros y tetrameros para formar procianidinas (taninos condensados). También se encuentran antocianinas: cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido, dos de los compuestos principales reportados para el güiscoyol (17,18,24) y para extractos de bayas como la mora, arándanos, arándanos rojos, bayas del Saskatoon, grosella negra, frambuesa, fresas, uvas, entre otras; frutas que tienen reportes de múltiples efectos beneficiosos sobre la salud y una buena capacidad antioxidante (65,155,165–167). El extracto de güiscoyol costarricense también contiene quercetina-3-rutinósido (rutina), presente en otras matrices como el té, fresas, mora, arándanos y duraznos (65,155).

Determinación de la actividad antioxidante

Las propiedades antioxidantes de polifenoles varían enormemente según la especie y variedad de la fruta que se estudie y vienen determinadas mayoritariamente por su estructura. Específicamente, la cantidad de hidrógenos disponibles para donar determina su actividad antioxidante, la cual comprende su capacidad para barrer radicales libres (como superóxido, peróxido y otros). Esta característica también determina su potencial para inhibir la peroxidación lipídica y mostrar actividad citotóxica. La capacidad de las antocianinas para barrer radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica es mayor según el tipo (delfinina>cianidina>pelargonidina) y la cantidad de cada una presente en la matriz (165,168–173). El EPG contiene cianidinas, por lo que es de esperar una buena capacidad del extracto para barrer radicales libres.

Determinación del efecto barredor de NO

En el presente trabajo se determinó la acción barredora del extracto sobre el óxido nítrico, utilizando concentraciones de EPG entre 0,5-1,6 mg/mL. El EPG no presentó buena actividad para barrer óxido nítrico, ya que la concentración para disminuir a la mitad la concentración de nitritos ($324 \pm 11 \mu\text{g/mL}$) es mucho mayor que la de quercetina ($19,4 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) y otras fuentes como la mora y la curcumina, para las cuales se ha reportado una buena actividad barredora de NO (167,174). Para distintas variedades de mora de clima

templado, se reportan IC_{50} desde 15,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta 36 $\mu\text{g/mL}$ (175,176) y $24,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ para un extracto de polifenoles de mora costarricense, variedad “vino con espinas”, obtenido de la misma manera que el EPG (167). Esta diferencia podría radicar en la composición fitoquímica de ambos extractos.

Existen varios reportes de la actividad vasodilatadora de las proantocianinas y antocianinas presentes en el jugo de uvas, vino tinto y otras fuentes (177–180). Las procianidinas de la manzana y los extractos de semilla de uva inducen la vasodilatación del endotelio de tejidos animales, dependiente de las concentraciones de óxido nítrico. Las proantocianidinas de la cacao, arándanos, uvas y nueces aumentan la biodisponibilidad del NO. Estas matrices son ricas en dímeros, trímeros, tetrámeros y heptámeros de epicatequinas, al igual que el EPG (181). La poca capacidad del EPG para barrer el NO se podría explicar por su contenido de procianidinas, las cuales podrían haber más bien contribuido a mantener la concentración de óxido nítrico *in vitro* generada por el SNP. Sería importante investigar más a fondo el efecto del EPG sobre la producción o mantenimiento de las concentraciones de óxido nítrico.

Actividad barredora de radicales por el método DPPH

Los compuestos fenólicos muestran, por lo general, una buena actividad para barrer el radical libre DPPH, según su estructura química. La presencia de dos grupos hidroxilo en la posición orto en el anillo B es fundamental para barrer el radical DPPH de forma efectiva (18).

A una concentración $3,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, el EPG logró una reducción del 50% en la concentración del radical DPPH. Un estudio realizado en Finlandia con un extracto de catequina, epicatequina y procianidinas de arándanos (*V. oxycoccos* L) y arándanos rojos (*V. vitisidaea* L), mostró una actividad barredora de radicales de más del 50% de actividad, a una concentración de 8,3 $\mu\text{g/mL}$ (170,183). Con un perfil fitoquímico muy similar, el EPG es más efectivo para barrer el radical DPPH que los extractos de arándano. Una variedad de mora denominada “vino con espinas”, recolectada en Costa Rica tiene una IC_{50} de 2,57

$\mu\text{g/mL}$ (167) posiblemente por la diferencia en la composición fitoquímica de ambos extractos.

El EPG logró la reducción del radical libre DPPH en un 88% a una concentración de 5,6 $\mu\text{g/mL}$. El arándano azul o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) y la baya de cuervo (*Empetrum nigrum*) muestran actividad barredora de DPPH entre 61 y 90%, respectivamente, ambas a una concentración de 2 mg/mL (172), un efecto bastante menor al observado con el EPG. Probablemente, los polifenoles presentes en el EPG como los flavonoles, que no se encontraron en el extracto de arándano azul ni de la baya de cuervo, sean los responsables de este efecto.

La cianidina-3-glucósido es una de las antocianinas que posee una de las mayores actividades barredoras del radical DPPH (157,182). Para el güisoyol, Osorio *et al.* (2011) (18) reportaron que las antocianinas más activas para barrer el radical DPPH fueron la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido, en comparación con la peonina-3-glucósido (también presente en el extracto colombiano). La actividad para contrarrestar este radical fue mayor cuando las dos cianidinas se encontraban juntas, en comparación con la actividad de cada una por separado. Probablemente, la presencia de ambas antocianinas en el EPG haya contribuido a su actividad para barrer el DPPH.

Por su parte López *et al.* (2017) (27) reportaron que los extractos acetónicos de la pulpa y la semilla tuvieron una capacidad antioxidante comparable con la de la vitamina C. Datos sin publicar el Departamento de Bioquímica reportan una IC_{50} de $3,74 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ para la vitamina C, siendo comparable la actividad del EPG con la del ácido ascórbico, de forma consistente con los resultados encontrados por López *et al.* (2017).

La quercetina cumple con todas las condiciones estructurales de un agente antioxidante por excelencia y es el polifenol más abundante en la dieta (162,168), por lo que es un punto de referencia importante con el cual comparar la capacidad antioxidante del EPG.

En comparación con la quercetina ($2,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), se puede decir que el EPG tiene una buena capacidad para barrer el radical DPPH.

Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC

El ORAC es un método de referencia para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos, ya que integra el grado de inhibición de la oxidación y el tiempo en el que sucede en un mismo reporte (184,185). Existe una tendencia a encontrarse valores elevados de ORAC entre mayor sea la concentración de polifenoles y antocianinas presentes en frutas o extractos (184,186–188). Para el EPG se obtuvo un valor alto de ORAC ($9791 \pm 390 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto), en concordancia con la observación anterior.

El ORAC del EPG es mucho más alto que un extracto de polifenoles de mora costarricense (*Rubus adenotrichos*) obtenido con el mismo procedimiento ($4339 \pm 144 \text{ mmol TE/g}$) y otro extracto de polifenoles obtenido a partir de la preparación de un jugo de mora microfiltrado de la misma variedad de fruta, con un valor de $7791 \pm 185 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto (134). Denev *et al.* (2010) (189) determinaron valores de ORAC para extractos de antocianinas de diferentes bayas, obtenidos mediante la extracción en fase sólida con la resina XAD-7: $5783 \pm 202 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto de saúco negro (*Sambucus nigra*), $5646 \pm 102 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto de arándano azul (*Vaccinium myrtillus*), $5165 \pm 223 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto de aronia (*Aronia melanocarpa*), $4042 \pm 88 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto de mora (*Rubus fruticosus*) y $3949 \pm 121 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto de grosella negra (*Ribes nigrum*) (189).

Diferentes formas glicosiladas tienen diversos efectos sobre la capacidad antioxidante de las antocianinas. En este sentido, la cianidina-3-glucósido presenta una buena actividad antioxidante contra el radical peroxilo, determinada por el método ORAC (78,190,191) y esto podría estarse reflejándose en el valor para el EPG.

En comparación con la quercetina ($13410 \pm 376 \mu\text{mol TE/g}$), el EPG muestra una capacidad antioxidante inferior. Las flavonoles como la quercetina presentan actividades antioxidantes por el método ORAC mayores que las antocianinas como la cianidina, por la

presencia del doble enlace entre C2 y C3, en conjunto con el grupo oxo en C4 del anillo C, típico en la quercetina (78). La catequina, es el compuesto que muestra el mayor efecto protector contra el radical AAPH, seguido de (-)-epicatequina, ácido cafeico, epicatequina galato, (-)-epigallocatequina galato y otros (192), lo que se puede ver reflejado en la comparación de actividades entre catequina ($22022 \pm 132 \mu\text{mol TE/g}$) y el EPG.

El radical peroxilo que es evaluado en la prueba de ORAC es comúnmente encontrado en el cuerpo en condiciones fisiológicas y reacciona de forma moderada frente a moléculas biológicas. Determinar la capacidad del EPG para barrer este radical da una aproximación de su actividad para donar hidrógeno, de su efectividad para romper la cadena oxidativa y su posible utilidad para prevenir daño causado por radicales libre (38,193–195), en matrices biológicas.

Efecto inhibitorio del EPG sobre los ROS intracelulares

Los métodos anteriores indican el potencial antioxidante del EPG determinado mediante métodos fisicoquímicos, pero no aportan evidencia que este extracto posea actividad antioxidante en matrices biológicas. Las antocianinas se caracterizan por sus propiedades antioxidantes y se ha demostrado que las proantocianidinas protegen a las células en cultivos celulares de la acción de los ROS inducidos por el TBHP (196,197). Por lo tanto, la inhibición de la acción de ROS sobre una sonda fluorescente en células Vero, puede ser un indicador de la capacidad del EPG para proteger matrices biológicas de la acción de los radicales libres intracelulares inducidos por el TBHP. La adición de EPG a las células Vero disminuyó la intensidad de la fluorescencia intracelular de forma proporcional a la concentración del extracto, lo que indica la entrada del EPG a las células evitando la acción oxidativa de los ROS sobre la sonda. Varios estudios han demostrado que algunos polifenoles son capaces de difundir por las membranas celulares y prevenir la producción de ROS intracelulares. La curcumina, el principal polifenol encontrado en el rizoma de la cúrcuma, demostró difundir a través de la membrana de células de músculo de ratón y prevenir la producción de ROS (198). Un extracto de la fresa de junio o sakatoon (*Amelanchier alnifolia*) suprimió la oxidación de la sonda fluorescente DCFDA de forma

dependiente a su concentración (165). Por su parte, la quercetina suprimió los niveles intracelulares de ROS producidos por H₂O₂, en células HepG2-C8, de forma dosis dependiente (199).

La concentración del EPG para inhibir la oxidación de la sonda por los radicales libres al 50% es de $153 \pm 13 \mu\text{g/mL}$. Un estudio con un extracto de mora costarricense (*Rubus adenotrichos*) reportó un IC₅₀ entre $204 - 220 \pm 10 \mu\text{g/mL}$ (134). La mayor capacidad del EPG para proteger contra la actividad oxidante de ROS intracelulares, posiblemente se relacione con el tipo de flavonoides presentes en el extracto entre ellos la catequina, la epicatequina y las procianidinas para las cuales otros estudios han logrado demostrar que previenen la oxidación de la sonda por los ROS y son buenas barrederos de radicales libres (200–203).

Evaluación de la actividad protectora de la peroxidación lipídica

La oxidación lipídica provocada por los radicales libres sobre la membrana celular causa alteraciones estructurales en ella y afecta su función biológica, resultando en la aparición y progresión de muchas enfermedades cardiovasculares, daños cognitivos, neurodegenerativos y cáncer (204). En este trabajo se evaluó la inhibición de la peroxidación por efecto del EPG sobre la membrana de eritrocitos y el efecto sobre la concentración de MDA en homogenizados de hígado de ratas sometidos a estrés oxidativo.

Efecto protector del EPG sobre peroxidación lipídica en eritrocitos por el método ERYCA

Los eritrocitos son células ideales para estudiar la capacidad de los antioxidantes para evitar el daño oxidativo por varias razones: transportan y metabolizan antioxidantes *in vivo*, transportan oxígeno y contienen metales de transición como el hierro; barren ROS y RNS, no contienen núcleo por lo que no producen ROS mitocondriales; tienen la mayoría de las enzimas redox endógenas y tienen gran cantidad de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (149,205,206).

Los eritrocitos tienen una serie de proteínas en la bicapa lipídica con diferentes particularidades químicas que permiten el estudio de la interacción de los flavonoides con la membrana celular. Los flavonoides interactúan con las membranas biológicas según su polaridad y los grupos hidroxilo presentes en el anillo B, factores que les permiten incorporarse y ubicarse en la membrana, aumentando su fluidez o rigidez, e impidiendo el acceso de agentes oxidantes al interior de la célula (201,206,207). El AAPH es un agente hidrosoluble que produce rápidamente radicales libres en presencia de oxígeno que atacan la parte externa de la membrana celular (208).

Se observó que el extracto del güiscol inhibe la hemólisis de los eritrocitos de forma comparable con la actividad de la quercetina (40 μ M). La capacidad inhibitoria del EPG fue de $3,65 \pm 0,15$ mmol QE/g de extracto, posiblemente por los compuestos fitoquímicos que tiene. Diversos estudios han determinado que la epicatequina, catequina y procianidina B2 tienen buena capacidad para proteger los eritrocitos contra los radicales peroxilo producidos por el AAPH (208). El EPG contiene catequinas, epicatequinas, procianidinas, cianidinas y quercetinas, por lo que se podría esperar que los polifenoles del extracto de güiscol protejan la membrana de los eritrocitos de los radicales producidos por el AAPH.

Hay estudios que demuestran la capacidad de los polifenoles para proteger a los eritrocitos del estrés oxidativo provocado por radicales libres. Las antocianinas, las epicatequinas y epigallocatequinas propician la integridad de la membrana; y las procianidinas B1 mantienen la integridad de la membrana, previenen la interacción entre oxidantes y los lípidos presentes e impiden la pérdida de moléculas pequeñas (200,204,209–212). Específicamente, las antocianinas de arándanos, entre ellas la cianidina-3-glucósido, se acumulan en la membrana eritrocítica, impidiendo la acción de los ROS (210); y las antocianinas de la cáscara de uvas inhiben la hemólisis causada por los radicales peroxilo producidos por AAPH (209). Por su parte, la (+) catequina y la (-) epicatequina protegen contra el daño causado por AAPH, prolongando en más de un 100% el tiempo necesario para la hemólisis (192). Por otro lado, la actividad barredora de radicales libres de estos

compuestos y de las procianidinas contribuye con la reducción de la peroxidación lipídica (205,206).

Las antocianinas con múltiples grupos hidroxilo se unen electrostáticamente a la superficie de membrana, aumentando su rigidez; mientras que las que tienen menos grupos hidroxilo pasan a la región hidrofóbica de la membrana, aumentando la fluidez de la misma y evitando la propagación de la peroxidación lipídica (204). Entre más hidrofílico sea el flavonoide, como las catequinas, epicatequinas y procianidinas (200), más se adsorbe en la membrana celular al interactuar con la cabeza polar de los fosfolípidos, confiriéndole más protección. En ambos casos, las antocianinas protegen la membrana celular de la oxidación por radicales libres.

Bonarska-Kujawa *et al* (2011) (213) y Bonarska-Kujawa *et al* (2014) (214) demostraron que extractos de manzana, fresa, *Aronia melanocarpa* y *Rubus nigrum* L., ricos en procianidinas, catequinas, epicatequinas, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y quercetina-3-rutinósido (entre otros), se adsorben en la capa externa de eritrocitos sin llegar a penetrar hacia la zona hidrofóbica de la membrana (213,214). Un estudio con un extracto de hojas de maqui (*Aristotelia chilensis*), rico en estos compuestos, demostró la adsorción de los mismos en la parte externa de la bicapa lipídica (215). Por su parte, la quercetina interacciona con los componentes de la membrana celular y aumenta su rigidez (207,216). Por el perfil fitoquímico del EPG, podría ser posible que estos compuestos protejan la membrana de los eritrocitos y por lo tanto, sería necesario realizar estudios que permitan evaluar su acción en detalle.

Efecto protector del EPG sobre peroxidación lipídica en homogenizados de hígado de rata

Como se discutió en el apartado anterior, la presencia de flavonoides cerca de las membranas biológicas causa interacciones con las proteínas y lípidos presentes, impidiendo la entrada de moléculas dañinas hacia el interior de las células y barriendo radicales libres en la superficie (200,206,207). Aun cuando el mecanismo específico por el cual determinados polifenoles inhiben la oxidación no es claro, se ha propuesto que pueden actuar como

donadores de hidrógeno y detener la reacción en cadena producida por radicales alcoxilo y peroxilo (217), producidos por el TBHP.

Los ROS reaccionan con los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados generando hidroperóxidos mediante una cadena de peroxidación. Uno de los principales productos secundarios de esta oxidación es el MDA, el cual se ha relacionado con procesos patológicos como la mutagénesis y la aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con el daño oxidativo, razón por la cual se utiliza para cuantificar el grado de lipoperoxidación en muestras biológicas como plasma y tejidos de hígado, riñones, pulmones, entre otros (218–220).

Hasta el momento, el efecto del *B. guineensis* sobre la inhibición de la peroxidación lipídica no había sido evaluado. En el presente trabajo se observó una disminución de MDA, dependiente de la concentración de EPG, en homogenizados de hígado tratados con TBHP. En este trabajo, la concentración para disminuir al 50% la generación de sustancias reactivas al TBA (reportado como concentración de malondialdehído/g de tejido) fue de $52,8 \pm 3,7$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, una actividad intermedia entre el Trolox (IC_{50} de $43,1 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la mora costarricense *Rubus adenotrichos* (IC_{50} de $20,3 \pm 4,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (167).

En la literatura existe amplia evidencia de la capacidad de los polifenoles para disminuir las concentraciones de MDA luego de un reto oxidativo, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios en animales suplementados con dietas ricas en antocianinas, flavonoles, flavanoles y procianidinas de fresas, cacao y té verde, han demostrado ser efectivas para disminuir los niveles de MDA en hígado de animales sanos y de animales sometidos a un estrés oxidativo (221,222). Un meta análisis de estudios en tejidos y suero de animales demostró que los niveles de MDA eran casi tres veces más bajos en los grupos experimentales tratados con procianidinas, en comparación con los grupos control (196). Los monómeros de catequina y las procianidinas protegen de la lipoperoxidación por ROS generados tanto en la fase hidrofílica como en la fase hidrofóbica de la membrana. Entre menor sea la cantidad de unidades de epicatequina (dímeros y trímeros), la acción es mejor contra ROS

hidrosolubles, mientras que procianidinas con mayor número de unidades se podrían insertar en la membrana y actuar como barredores de radicales (223). Con base en lo anterior, sería de esperar que la presencia de procianidinas y catequinas en el EPG ofrezca una buena protección contra la peroxidación lipídica en matrices biológicas.

Determinación de la actividad citotóxica

Determinación del efecto citotóxico selectivo del EPG sobre líneas celulares tumorales

Un compuesto natural con actividad citotóxica prometedora es aquel cuyo extracto crudo muestra valores de IC_{50} menores a 30 $\mu\text{g/mL}$ cuando se prueba en células tumorales (224,225,226). Un agente citotóxico ideal es aquel que tiene poca toxicidad sobre las células sanas, buena eficacia contra diversos tipos de cáncer, apto para consumo oral para mayor comodidad y adherencia del paciente, y con un mecanismo de acción conocido, entre otros factores (93). En este trabajo se utilizó la prueba MTT para medir la viabilidad celular, sin someter a las células a ningún estrés oxidativo adicional, por lo que se midió la capacidad del EPG para interferir con la actividad metabólica de las células tumorales. En este sentido, el EPG mostró un valor de IC_{50} mayor de 100 $\mu\text{g/mL}$ para la línea tumoral de estómago AGS y la línea no tumoral de riñón de mono (Vero), descartándose de esta manera una buena actividad citotóxica sobre el adenocarcinoma gástrico. Por el contrario, para la línea tumoral de adenocarcinoma de colon (SW620), la IC_{50} fue de $16,2 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$.

Tal y como en el caso del EPG, diversos estudios *in vitro* han comprobado que los flavonoides tienen un fuerte potencial antioxidante y citotóxico. En general, han demostrado ser poco tóxicos sobre células normales y bastante eficaces en la inhibición de la proliferación en muchas líneas celulares cancerígenas (93,227–229).

La actividad citotóxica de los flavonoides sobre el tracto gastrointestinal ha sido ampliamente estudiada. En cáncer de colon se ha observado que la estructura química y el grado de polimerización, son determinantes para la citotoxicidad de estos compuestos. Algunos flavonoides, por sus características estructurales, no se absorben en el tracto

gastrointestinal alcanzando el colon de forma intacta donde ejercen su actividad sobre las células epiteliales. Las procianidinas oligoméricas son un ejemplo de esta característica (230,231).

Estudios en líneas celulares de cáncer de colon no metastásico, como HT29, HCT116, Caco2 y SW480, han demostrado que la quercetina, la rutina, las catequinas, las antocianinas y procianidinas tienen actividad citotóxica sobre ellas. Las antocianinas, como la delphinidina, pelargonidina, cianidina y otras también muestran efectos citotóxicos en líneas de cáncer de colon metastásicas como la LoVo y LoVo/ADR (232).

Diversos extractos ricos en antocianinas (principalmente glicósidos de cianidinas) de arándanos, moras, grosellas negras, airelas o arándano rojo (*Vaccinium vitisidaea*), fresas, uvas, aronia (*Aronia meloncarpa*) y cerezas demostraron ser más efectivos que otros flavonoides para inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon, sin alterar células colónicas sanas (117,160,233,234). Un extracto comercial rico en antocianinas de arándanos y grosellas negras y otro de antocianinas de *Aronia melanocarpa* inhibieron la proliferación de las líneas celulares de carcinoma de colon Caco2 y HT29, en un rango de concentraciones entre 25 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente (235,236). Una investigación reportó un IC₅₀ de 64,50 µg/mL para un extracto de mora (*Rubus sp*) en células HT29, y una IC₅₀ cercano a 90 µg/mL para extractos de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) y frambuesa negra (*Vaccinium macrocarpon*), tanto en las líneas celulares HT29 como HCT116 (237). Estas bayas han demostrado inhibir la proliferación celular a concentraciones mayores a la observada con el EPG.

Un extracto rico en procianidinas del *Vaccinium vitisidaea* presentó un valor de IC₅₀ de 38,3 µg/mL en células Caco2 (238). Un extracto rico en procianidinas de manzana, compuesto principalmente por (-) epicatequina y (+) catequina demostró una inhibición dependiente de la concentración, del crecimiento celular de las células de adenocarcinoma de colon SW620, con una IC₅₀ de 45 µg/mL (239). Con un perfil de procianidinas similar, el EPG muestra una mejor actividad sobre esta línea celular. Las procianidinas de las semillas

de la uva han demostrado inhibir el crecimiento de las células de cáncer de colon HT29 y en la línea LoVo (240,241). Las procianidinas A2 presentes en los arándanos *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitisidaea* lograron valores de IC₅₀ de 24,7 y 24,3 µg/mL en la línea SW620 luego de 48 horas de incubación, valores más bajos que las procianidinas B2 de la manzana, y ligeramente mayores a la IC₅₀ obtenida con el EPG (242).

La literatura indica que la combinación de procianidinas y antocianinas parece tener un efecto sinérgico sobre algunas líneas celulares (230–232,286,241). En el caso del EPG, la presencia de procianidinas y antocianidinas podría estar determinando su actividad citotóxica.

En cuanto a la línea celular AGS, dos estudios realizados con extractos ricos en polifenoles (cianidina-3- glucósido, catequina, epicatequina, quercetina rutinósido y procianidinas B) de bayas chilenas (*Rubus geoides* y *Ribes cucullatum*, *Ribes magellanicum*, *Ribes punctatum* and *Ribes trilobum*) demostraron que estos extractos no presentan actividad citotóxica en esta línea, con IC₅₀ entre 800 y 1000 µg/mL para el caso de *Rubus geoides* y entre 300 y 500 µg/mL para las *Ribes spp.* Los autores concluyen que estos extractos no muestran toxicidad hacia esta línea celular, mientras que por el contrario, le atribuyen un efecto citoprotector ante un reto oxidativo con H₂O₂ (245,246). Por otro lado, se reporta que la cianidina-3-glicósido conserva la viabilidad celular de las AGS entre 80-85% luego de 48 h de incubación (247). EL EPG tampoco demostró un efecto citotóxico importante en esta línea celular (113,6 ± 2,4 µg/mL), con un perfil de flavonoides muy similar al de estas bayas.

Un índice de selectividad igual o superior a 2 implica que el compuesto o extracto es dos veces más citotóxico en las líneas tumorales que en líneas normales e igual, mientras que si es mayor a tres se considera un compuesto o extracto con potencial terapéutico (152,153, 243,244). La línea Vero se utilizó para estimar el índice de selectividad del EPG con respecto a cada línea celular tumoral. En el caso del EPG, este extracto muestra poca selectividad por la línea AGS, mientras que presentó una alta selectividad por la línea SW620, con un valor superior a 10.

Apoptosis como posible mecanismo de muerte celular del EPG sobre la línea de adenocarcinoma de colon SW620

A partir del resultado del índice de selectividad y la actividad citotóxica para la línea celular tumoral SW620, se procedió a determinar un posible mecanismo de acción citotóxico del EPG, mediante la prueba de tinción con anexina y yoduro de propidio. Luego de 48 h se observa que las células tratadas con EPG, en distintas concentraciones (5,10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se encuentran vivas en apoptosis temprana, mientras que las que fueron tratadas con camptotecina se observan en apoptosis tardía. En la línea celular SW620, los análisis de anexina-yoduro de propidio mostraron que una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indujo un mayor porcentaje de células A+PI- (51% \pm 3), es decir, células en apoptosis temprana y en menor grado, células en apoptosis tardía (A+PI+) (18,1% \pm 4,8).

En el presente trabajo, comparó la actividad apoptótica del EPG con la actividad de la camptotecina como control de apoptosis. La camptotecina es un alcaloide aislado del árbol *Camptotheca acuminata* que ha sido el precursor de varios derivados, entre ellos el irinotecan y topotecán, que actualmente se utilizan en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. La camptotecina fue aprobada por la FDA para su uso en carcinoma de colon refractario. Este compuesto, actúa impidiendo la replicación del ADN al unirse con la topoisomerasa I y provocando apoptosis (136,248).

La inducción de apoptosis, o muerte celular programada, se considera un blanco importante en la prevención del cáncer, ya que ésta se encuentra alterada en esta patología (70,227). La apoptosis se puede desencadenar por múltiples estímulos, entre ellos el estrés oxidativo y diversos agentes citotóxicos. Dos de los mecanismos por los cuales los flavonoides inducen la apoptosis son la modulación de la actividad de los ROS y la inhibición de las ADN-topoisomerasas I y II (76,77,93,95,116,121,249,250). Los flavanoles, la epigallocatequina y la catequina; las flavanonas (hesperetina, naringina), la flavona apigenina, los flavonoles como la quercetina, han demostrado propiciar la apoptosis en líneas celulares de cáncer cervical, cáncer de seno, cáncer de colon y estómago, cáncer hepático, leucemia (60,116,232,251,252). Para la quercetina se ha reportado que induce además estrés oxidativo

con aumento de ROS y dispara la apoptosis, en células de carcinoma colónico humano. También se le atribuye la inhibición de las topoisomerasas I y II (116,227,251).

Por su parte, las antocianinas y las procianidinas han demostrado inducir apoptosis en cáncer de pulmón, oral, de seno, de piel, próstata y de colon, por acumulación de ROS en las células cancerígenas, efecto contrario al que ejercen sobre células normales, mediante mecanismos poco claros. Las antocianinas de los arándanos azules, cianidina-3-glicósido, delfinidina y peonidina-3-glicósido suprimen el crecimiento tumoral de células de cáncer de seno y colon mediante apoptosis (155,227,237,241,242,251,253,254). Extractos de antocianinas de mora y fresas mostraron efectos pro apoptóticos en líneas celulares de cáncer de colon (237).

En la línea tumoral SW620, extractos de diversas fracciones de arándano azul (*Vaccinium myrtillus*), de manzana y arándano rojo (*Vaccinium vitisidaea*) lograron un 95%, un 64% y un 37% de células apoptóticas, respectivamente, a una concentración de 75 µg/mL (242). Otro estudio determinó que un extracto de procianidinas de la manzana provocó un 50% de apoptosis a una concentración de 45 µg/ml y un 100% a 70 µg/mL (239). El EPG logró un 69% de apoptosis en las células SW620 a una concentración de 20 µg/mL, un porcentaje similar al estándar de manzana posiblemente porque ambos extractos contienen procianidinas. El EPG contiene procianidinas B1, antocianinas, catequina, epicatequinas y quercetinas, que podrían contribuir sinérgicamente con su actividad apoptótica.

Algunos flavonoides, como la catequina y la quercetina, alteran la funcionalidad de las topoisomerasas; las antocianinas, tales como la cianidina y la delfinidina que contienen un grupo hidroxilo en el anillo B, inhiben la acción catalítica de las topoisomerasas, especialmente la topoisomerasa II (250). Flavonoides, como la galatoepigallocatequina (EGCG) y las procianidinas B2 son inhibidores de la actividad catalítica de las topoisomerasas I y II, uniéndose a la enzima antes de su interacción con la hebra de ADN (255,256). Dos extractos de semilla de uva, uno rico en antocianinas y otro rico en procianidinas y catequina, demostraron de forma individual inhibir la actividad catalítica de

la topoisomerasa II y mostraron una acción aditiva sinérgica en esta inhibición al probarse ambos de forma conjunta sobre la acción de la topoisomerasa II (255). El EPG tiene un perfil fitoquímico similar a estos dos extractos juntos, por lo que sería importante determinar si el EPG tiene efecto sobre las topoisomerasas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El contenido de polifenoles totales del EPG, se correlaciona con la actividad antioxidante observada para este extracto, lo que demuestra que el güiscol es una fruta con mucho potencial antioxidante.

El EPG pareciera no tener un buen efecto barredor de óxido nítrico, sino que pudiera ser que favorezca el mantenimiento de sus concentraciones *in vitro*. En este sentido, es necesario realizar pruebas específicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para comprobar el efecto sobre las concentraciones de óxido nítrico observado en este trabajo.

El EPG mostró buena protección contra la peroxidación lipídica, factor desencadenante de varias enfermedades (cardiovasculares, neurológicas). Es importante profundizar en el mecanismo de acción sobre las membranas biológicas.

El EPG presentó un efecto citotóxico y selectivo en la línea celular de cáncer de colon metastásico SW620, mediante la inducción de apoptosis temprana. El efecto sobre el cáncer de colon metastásico podría atribuirse a la sinergia entre los compuestos bioactivos del EPG.

Es conocido que la interacción de la microbiota intestinal con los flavonoides juega un papel importante en su absorción y biodisponibilidad. Este tipo de compuestos bioactivos sufre un extenso metabolismo intestinal y hepático antes de ser excretados por la orina. Una vez metabolizados, sus actividades biológicas se pueden ver modificadas por cambios estructurales en sus grupos funcionales. Es importante realizar estudios *in vivo* con el EPG, que permitan determinar la biodisponibilidad de sus compuestos bioactivos desde el tracto gastrointestinal, específicamente en colon, donde se da la mayor interacción de los polifenoles con la microbiota. Igualmente, es necesaria la identificación de los metabolitos del EPG excretados por la orina, con el fin de establecer una posible relación entre las actividades biológicas observadas en este trabajo y los metabolitos de los flavonoides presentes en este extracto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chízmar Fernández C, Instituto Nacional de Biodiversidad (Costa Rica). Plantas comestibles de Centroamérica. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio); 2009.
2. Khullar M, Relan V, Sehrawat BS, Sherawat BS. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2004;43(2):e7-8. doi: 0.1161/01.hyp.0000111210.34843.b6
3. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001;54(3):176-86. doi: 10.1136/jcp.54.3.176
4. Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, *et al*. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol*. 2001;154(4):348-56. doi: 10.1093/aje/154.4.348
5. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 2002;127(1):183-98. doi: 10.1039/b009171p
6. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(4):275-95. doi: 10.1080/10408690490468489
7. Hermes-Lima M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. En: *Functional Metabolism* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [citado 28 de enero de 2020]. p. 319-68. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/047167558X.ch12>
8. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41(12 Pt 2):1819-28. PMID 7497639
9. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2004;3(1):21-33. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x
10. Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J Am Coll Nutr*. 2005;24(1):44-50. doi: 10.1080/07315724.2005.10719442
11. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and

- bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):230S-242S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S
12. Amiot MJ, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review: Polyphenols and metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2016;17(7):573-86. doi: 10.1111/obr.12409
13. Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Kew Bulletin.* 2005;60:559-569.
14. Henderson A. *Bactris* (Palmae). *Flora Neotropica Monograph* 79. The New York Botanical Garden Press. 2000. pp 1-181. ISBN-10: 0893274321
15. Gil, Johanna, Prada, Ronny. Caracterización de las propiedades físicas de la palma de lata | Hoja | Tallo de la planta [Internet]. [Colombia]: Universidad Industrial de Santander; 2008 [citado 24 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/318922076/Caracterizacion-de-las-propiedades-fisicas-de-la-palma-de-lata>
16. Graefe S, Dufour D, van Zonneveld M, Rodriguez F, Gonzalez A. Peach palm (*Bactris gasipaes*) in tropical Latin America: implications for biodiversity conservation, natural resource management and human nutrition. *Biodivers Conserv.* 2013;22(2):269-300. doi: 10.1007/s10531-012-0402-3
17. Osorio C, Acevedo B, Hillebrand S, Carriazo J, Winterhalter P, Morales AL. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *J Agric Food Chem.* 2010;58(11):6977-85. doi: 10.1021/jf100536g
18. Osorio C, Carriazo J, Almanza O. Antioxidant activity of corozo (*Bactris guineensis*) fruit by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Eur Food Res Technol.* 2011;233:103-8. doi: 10.1007/s00217-011-1499-4
19. Haynes J, McLaughlin J. *Edible Palms and Their Uses* 1. 2000.
20. Serrano M, Umaña G, Sáenz MV. Serrano M, Umaña G, Sáenz MV. Fisiología poscosecha, composición química y capacidad antioxidante de frutas de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth) cv. Tuirá Darién cosechadas a tres diferentes edades. *Agron Costarric.* 2011;35(2). ISSN 0377-9424.

21. Fernández-Piedra M. Contenido de ácidos grasos en cuatro poblaciones de pejibaye, *Bactris gasipaes* (Palmae). *Rev Biol Trop*. 1995; 43(1-3):61-66.
22. Jatunov, Sorel, Quesada S, Díaz, Cecilia. Carotenoid composition and antioxidant activity of the raw and boiled fruit mesocarp of six varieties of *Bactris gasipaes* *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2010;60(1):99-104.
23. Castañeda LGS-, Bugallo ARB-, Celis C, Iglesias J, Morales L. Evaluation of antioxidant and cytotoxic activity of extracts from fruits in fibroblastoma HT1080 cell lines: four fruits with commercial potential in Colombia. *Emir J Food Agric*. 2016;143-51. doi: 10.9755/ejfa.2015-11-1007
24. Rojano B, Cristina Zapata I, Cortes FB. Estabilidad de antocianinas y valores de capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (ORAC) de extractos acuosos de corozo (*Bactris guineensis*). *Rev Cuba Plantas Med*. 2012;17(3):244-55. ISSN 1028-4796
25. Masís, A, Espinoza, R, Guadamuz, A, Chavarría, F, Pérez, D. *Bactris guineensis* 13 junio 2000 [Internet]. *Bactris guineensis*. 1998 [citado 24 de marzo de 2020]. Disponible en: https://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/plantae_online/magnoliophyta/arecaceae/bactris_guineensis/b_guineensis30jun2000/b_guineensis30jun2000.html
26. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024
27. López S, Martí M, Sequeda LG, Celis C, Sutachan JJ, Albarracín SL. Cytoprotective action against oxidative stress in astrocytes and neurons by *Bactris guineensis* (L.) H.E. Moore (corozo) fruit extracts. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2017;109(Pt 2):1010-7. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.025
28. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *Int J Food Sci Technol*. 2001;36(7):703-25. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x
29. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(2):139-42. PMID: 20454707
30. Finley JW, Kong A-N, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *J Agric Food Chem*. 2011;59(13):6837-46. doi: 10.1021/jf2013875
31. Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, et al.

Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod.* 1999;62(2):294-6. doi: 10.1021/np980501m

32. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313-6. doi: 10.1074/jbc.272.33.20313

33. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2008;4(2):89-96. PMID: 23675073

34. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7915. doi: 10.1073/pnas.90.17.7915

35. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999;85(8):753-66. doi: 10.1161/01.res.85.8.753

36. Chen C-N, Wu C-L, Lin J-K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(1):53-66. doi: 10.1016/j.bcp.2003.07.020

37. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(10):1341-8. doi: 10.1016/0006-2952(95)00088-h

38. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine [Internet]. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press; [citado 24 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>

39. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 1995;322(2):339-46. doi: 10.1006/abbi.1995.1473

40. Bazzano, Lydia. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases. WHO; 2004.

41. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841-56. doi: 10.1021/jf030723c

42. Juranić Z, Zizak Z. Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors Oxf Engl.* 2005;23(4):207-11. doi: 10.1002/biof.5520230405

43. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82(4):513-23. doi: 10.1016/j.fitote.2011.01.018
44. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett*. 2004;558(1-3):3-6. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01526-6
45. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(4):287-306. doi: 10.1080/1040869059096
46. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*. 2009;674(1-2):137-47. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015
47. Jacob R. The integrated antioxidant system. *Nutr Res (N Y N USA)*. 1995;15(59):755-766. ISSN: 0271-5317
48. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med*. 1997;336(17):1216-22. doi: 10.1056/NEJM199704243361704
49. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):673-751. PMID: 11121513
50. Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res Rev*. 2007;56(2):322-30. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.07.005
51. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res (N Y N)* 2014;34(11):907-29. doi: 10.1016/j.nutres.2014.07.010
52. Xavier AAO, Pérez-Gálvez A. Carotenoids as a Source of Antioxidants in the Diet. *Subcell Biochem*. 2016;79:359-75. doi: 10.1007/978-3-319-39126-7_14
53. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-56. doi: 10.1016/0891-

5849(95)02227-9

54. Boudet A-M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 2007;68(22-24):2722-35. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.012
55. Sandoval-Acuña C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch Biochem Biophys*. 2014;559:75-90. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.017
56. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009;26(8):1001-43. doi: 10.1039/b802662a
57. Yoshihara D, Fujiwara N, Suzuki K. Antioxidants: benefits and risks for long-term health. *Maturitas*. 2010;67(2):103-7. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.05.001
58. Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem*. 2015;175:556-67. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013
59. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *J Funct Foods*. 2015;18:820-897
60. Kwee JK. Yin and Yang of Polyphenols in Cancer Prevention: A short review. anticancer agents. *Med Chem*. 2016;16(7):832-40. doi: 10.2174/1871520616666151116124549
61. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem*. 1999;47(6):2274-9. doi: 10.1021/jf9811065
62. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(3):560-8. doi: 10.1093/ajcn/76.3.560
63. Beekwilder J, Hall RD, Vos CHDR. Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. *BioFactors*. 2005;23(4):197-205. doi: 10.1002/biof.5520230404
64. Borges G, Degeneve A, Mullen W, Crozier A. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *J Agric Food Chem*. 2010;58(7):3901-9. doi: 10.1021/jf902263n
65. Balentine DA, Dwyer JT, Erdman JW, Ferruzzi MG, Gaine PC, Harnly JM, et al.

Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(6):1113-25. doi: 10.3945/ajcn.113.071274

66. Speisky H, López-Alarcón C, Gómez M, Fuentes J, Sandoval-Acuña C. First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America. *J Agric Food Chem.* 2012;60(36):8851-9. doi: 10.1021/jf205167k

67. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000;55(6):481-504. doi: 10.1016/s0031-9422(00)00235-1

68. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 2002;177(1):67-80. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00196-8

69. Vinson JA, Hontz BA. Phenol Antioxidant Index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem.* 1995;43(2):401-3. doi: 10.1021/jf00050a027

70. Brown EM, Gill CIR, McDougall GJ, Stewart D. Mechanisms underlying the anti-proliferative effects of berry components in in vitro models of colon cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(1):200-9. doi: 10.2174/138920112798868773

71. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13(10):572-84. doi: 10.1016/s0955-2863(02)00208-5

72. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997;2(4):152-9. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01018-2

73. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):317S-325S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.317S

74. Lewandowska H, Kalinowska M, Lewandowski W, Stępkowski TM, Brzóska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J Nutr Biochem.* 2016;32:1-19. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.006

75. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 1998;330(Pt 3):1173-8. PMID: 9494082

76. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickançaité E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(1-2):107-16. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00167-1
77. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(3):287-303. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034
78. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):749-60. doi: 10.1016/s0891-5849(96)00351-6
79. Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IM. Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(4):398-408. doi: 10.1021/tx000216e
80. Lee-Hilz YY, Boerboom A-MJF, Westphal AH, Berkel WJH van, Aarts JMMJG, Rietjens IMCM. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(11):1499-505. doi: 10.1021/tx060157q
81. Bertrand Teponno R, Kusari S, Spitteller M. Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat Prod Rep.* 2016;33(9):1044-92. doi: 10.1039/C6NP00021E
82. Polat Köse L, Gulcin I. Inhibition Effects of Some Lignans on Carbonic Anhydrase, Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzymes Leyla Polat Köse and İlhami Gülçin. *Rec Nat Prod.* 2017;(6):558-61. doi: 10.25135/rnp.71.17.04.074
83. Musa MA, Cooperwood JS, Khan MOF. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2664-79. doi: 10.2174/092986708786242877
84. Nofal ZM, El-Zahar MI, Abd El-Karim SS. Novel Coumarin Derivatives with Expected Biological Activity. *Molecules.* 2000;5(2):99-113. doi: 10.2174/092986708786242877
85. Dandriyal J, Singla R, Kumar M, Jaitak V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2016;119:141-68. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.087
86. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, et al.

Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth.* 2004;59(3):113-22. doi: 10.1007/s11130-004-0049-7

87. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, et al. *In vitro* and *in vivo* Antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):9236-82. doi: 10.3390/ijms16059236

88. de Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem Rev Proc Phytochem Soc Eur.* 2008;7(2):281-299. doi: 10.1007/s11101-007-9074-0

89. Santacruz L, Carriazo JG, Almanza O, Osorio C. Anthocyanin composition of wild Colombian fruits and antioxidant capacity measurement by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2012;60(6):1397-404. doi: 10.1021/jf2042533

90. Clifford MN. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):1063-72. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q

91. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2011;412(5-6):410-24. doi: 10.1016/j.cca.2010.11.034

92. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 2001;49(6):2774-9. doi: 10.1021/jf001413m

93. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev.* 2003;23(4):519-34. doi: 10.1002/med.10033

94. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004;36(7):838-49. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001

95. Chang H, Mi M, Ling W, Zhu J, Zhang Q, Wei N, et al. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*. *Arch Pharm Res.* 2008;31(9):1137-44. doi: 10.1007/s12272-001-1280-8

96. Sahu SC, Gray GC. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett.* 1993;70(1-2):73-9.

doi: 10.1016/0304-3835(93)90077-m

97. Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev.* 1997;55(11 Pt 1):396-8. doi: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb01580.x

98. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life.* 2000;50(3):167-71. doi: 10.1080/152165400300001471

99. Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauft J, et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(11):959-69. PMID: 12481418

100. Stoner G, Casto B, Ralston S, Roebuck B, Pereira C, Bailey G. Development of a multi-organ rat model for evaluating chemopreventive agents: efficacy of indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* 2002;23(2):265-72. doi: 10.1093/carcin/23.2.265

101. Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res.* 2000;33(2):55-64. doi: 10.4067/s0716-97602000000200004

102. Kris-Etherton Penny M., Harris William S., Appel Lawrence J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002;106(21):2747-57. doi: 10.1161/01.CIR.0000038493.65177.94

103. Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr Bethesda Md.* 2011;2(1):1-7. doi: 10.3945/an.110.000042

104. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, et al. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1998;18(19):8047-55. PMID: 9742171

105. Martin A, Prior R, Shukitt-Hale B, Cao G, Joseph JA. Effect of fruits, vegetables, or vitamin E--rich diet on vitamins E and C distribution in peripheral and brain tissues: implications for brain function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000;55(3):B144-151. doi: 10.1093/gerona/55.3.b144

106. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* 1999;149(10):943-9. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009738

107. Huxley RR, Neil H a. W. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57(8):904-8. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601624
108. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(1):38-50. doi: 10.1093/ajcn/88.1.38
109. Szmitko PE, Verma S. Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2005;288(5):H2023-30. doi: 10.1152/ajpheart.00868.2004
110. Cherniack EP. Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2011;27(6):617-23. doi: 10.1016/j.nut.2010.10.013
111. Du G, Sun L, Zhao R, Du L, Song J, Zhang L, et al. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol Ther.* 2016;162:23-34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.04.008
112. Hodgson JM, Croft KD. Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *J Sci Food Agric.* 2006;86(15):2492-8. doi: 10.1002/jsfa.2675
113. Hollman PCH, Geelen A, Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr.* 2010;140(3):600-4. doi: 10.3945/jn.109.116632
114. Petrone AB, Gaziano JM, Djoussé L. Effects of dark chocolate and cocoa products on endothelial function: A meta-analysis. *Curr Nutr Rep.* 2013;2(4):267-73. doi: 10.1007/s13668-013-0058-y
115. Cancer today [Internet]. [citado 16 de abril de 2020]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
116. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther.* 2001;90(2-3):157-77. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00137-1
117. Zhao C, Giusti MM, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem.* 2004;52(20):6122-8. doi: 10.1021/jf049517a
118. Wang J, Tang L, Wang J-S. Biomarkers of dietary polyphenols in cancer studies: Current evidence and beyond. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:732302. doi:

10.1155/2015/732302

119. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev.* 2000;13(1):79-106. doi: 10.1079/095442200108729016

120. Bowen-Forbes C, Zhang Y, Nair M. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *J Food Compos Anal.* 2010;23:554-60. doi: 10.1016/j.jfca.2009.08.012

121. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev.* 2014;8(16):122-46. doi: 10.4103/0973-7847.134247

122. Chen M, Zhao Z, Yu S. Cytotoxicity and apoptotic effects of polyphenols from sugar beet molasses on colon carcinoma cells *in vitro*. *Int J Mol Sci* 2016;17(7):993. doi: 10.3390/ijms17070993

123. Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2002;56(6):296-301. doi: 10.1016/s0753-3322(02)00186-5

124. Hasima N, Ozpolat B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1509. doi: 10.1038/cddis.2014.467

125. Papademetrio DL, Trabucchi A, Cavaliere V, Ricco R, Costantino S, Wagner ML, et al. The catechin flavonoid reduces proliferation and induces apoptosis of murine lymphoma cells LB02 through modulation of antiapoptotic proteins. *Rev Bras Farmacogn.* 2013;23(3):455-63. doi: 10.1590/S0102-695X2013005000025

126. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337

127. Ichim G, Tait SWG. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(8):539-48. doi: 10.1038/nrc.2016.58

128. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;6:183-97. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.008

129. Jeong C-H, Joo SH. Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *J*

Cancer Prev. 2016;21(1):13-20. doi: 10.15430/JCP.2016.21.1.13

130. Thakur VS, Deb G, Babcook MA, Gupta S. Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. *AAPS J.* 2014;16(1):151-63. doi: 10.1208/s12248-013-9548-5

131. Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, et al. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.* 2001;68(10):1207-14. doi: 10.1016/s0024-3205(00)01020-1

132. Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement JP. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):131-6. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02376-6

133. Bhat KPL, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:210-29. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02918.x

134. Azofeifa G, Quesada S, Pérez A, Vaillant F, Michel A. Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *J Food Compos Anal.* 2015;42:56-62. doi: 10.1016/j.jfca.2015.01.015

135. Pasqua G, Monacelli B, Mulinacci N, Rinaldi S, Giaccherini C, Innocenti M, et al. The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiol Biochem.* 2005;43(3):293-8. doi: 10.1016/j.plaphy.2005.02.009

136. Katzung B. *Basic & Clinical Pharmacology.* 2004. 9th edition. McGraw-Hill. ISBN-13: 978-0071410922

137. Ferraro C, Quemeneur L, Fournel S, Prigent AF, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. The topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide induce a CD95-independent apoptosis of activated peripheral lymphocytes. *Cell Death Differ.* 2000;7(2):197-206. doi: 10.1038/sj.cdd.4400595

138. Zeng C-W, Zhang X-J, Lin K-Y, Ye H, Feng S-Y, Zhang H, et al. Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. *Mol Pharmacol.* 2012;81(4):578-86. doi: 10.1124/mol.111.076794

139. Chu C, Xu J, Cheng D, Li X, Tong S, Yan J, et al. Anti-proliferative and apoptosis-inducing effects of camptothecin-20(s)-O-(2-pyrazolyl-1) acetic ester in human breast tumor

- MCF-7 cells. *Mol Basel Switz.* 2014;19(4):4941-55. doi: 10.3390/molecules19044941
140. Wang P, Heber D, Henning SM. Quercetin increased the antiproliferative activity of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate in prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* 2012;64(4):580-7. doi: 10.1080/01635581.2012.661514
141. Shakibaei M, Mobasheri A, Lueders C, Busch F, Shayan P, Goel A. Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF- κ B and Src protein kinase signaling pathways. *PLoS One.* 2013;8(2):e57218. doi: 10.1371/journal.pone.0057218
142. Zhou D-H, Wang X, Yang M, Shi X, Huang W, Feng Q. Combination of low concentration of (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) and curcumin strongly suppresses the growth of non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* through causing cell cycle arrest. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12023-36. doi: 10.3390/ijms140612023
143. Mertz C, Cheynier V, Günata Z, Brat P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2007;55(21):8616-24. doi: 10.1021/jf071475d
144. Gancel A-L, Feneuil A, Acosta O, Pérez AM, Vaillant F. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Res Int.* 2011;44(7):2243-51. doi: 10.1016/j.foodres.2010.06.013
145. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem.* 2005;53(5):1370-3. doi: 10.1021/jf048396b
146. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 2005; 88(5):1269-1278.
147. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
148. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang D. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J*

- Agric Food Chem. 2002;50(10):2772-7. doi: 10.1021/jf011480w
149. González E, Vaillant F, Rojas G, Pérez A. Novel semiautomated method for assessing in vitro cellular antioxidant activity using the light-scattering properties of human erythrocytes. *J Agric Food Chem.* 2010;58(3):1455-61. doi: 10.1021/jf903467x
150. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271-8. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1
151. Liu X-P, Zhou S-T, Li X-Y, Chen X-C, Zhao X, Qian Z-Y, et al. Anti-tumor activity of N-trimethyl chitosan-encapsulated camptothecin in a mouse melanoma model. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2010;29:76. doi: 10.1186/1756-9966-29-76
152. Koch A, Tamez P, Pezzuto J, Soejarto D. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *J Ethnopharmacol.* 2005;101(1-3):95-9. doi: 10.1016/j.jep.2005.03.011
153. Oliveira PF de, Alves JM, Damasceno JL, Oliveira RAM, Dias HJ, Crotti AEM, et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Rev Bras Farmacogn. de* 2015;25(2):183-8. doi: 10.1016/j.bjp.2015.02.009
154. Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, et al. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *J Agric Food Chem.* 2004;52(8):2391-6. doi: 10.1021/jf035372g
155. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24673-706. doi: 10.3390/ijms161024673
156. Yao L, Zhang N, Wang C, Wang C. Highly selective separation and purification of anthocyanins from bilberry based on a macroporous polymeric adsorbent. *J Agric Food Chem.* 2015;63(13):3543-50. doi: 10.1021/jf506107m
157. Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Food Agric.* 2003;83(14):1403-11. doi: 10.1002/jsfa.1511
158. Aqil F, Gupta A, Munagala R, Jeyabalan J, Kausar H, Sharma RJ, et al. Antioxidant

and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutr Cancer*. 2012;64(3):428-38. doi: 10.1080/01635581.2012.657766

159. Saucier C, Jourdes M, Glories Y, Quideau S. Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. *J Agric Food Chem*. 2006;54(19):7349-54. doi: 10.1021/jf061724i

160. Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem*. 2003;51(1):68-75. doi: 10.1021/jf025781x

161. Deighton N, Brennan R, Finn C, Davies HV. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric*. 2000;80(9):1307-13. doi: 10.1002/1097-0010(200007)80:9<1307::AID-JSFA638>3.0.CO;2-P

162. Wang W, Yagiz Y, Buran TJ, Nunes C do N, Gu L. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Res Int*. 2011;44(9):2666-73. doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.022

163. Motilva M-J, Serra A, Macià A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *J Chromatogr A*. 2013;1292:66-82. doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.012

164. Lin L-Z, Sun J, Chen P, Harnly J. UHPLC-PDA-ESI/HRMS/MS(n) analysis of anthocyanins, flavonol glycosides, and hydroxycinnamic acid derivatives in red mustard greens (*Brassica juncea* Coss variety). *J Agric Food Chem*. 2011;59(22):12059-72. doi: 10.1021/jf202556p

165. Hu C, Kwok BHL, Kitts DD. Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) scavenge free radicals and inhibit intracellular oxidation. *Food Res Int*. 2005;38(8-9):1079-1085. doi: 10.1016/j.foodres.2005.02.024

166. Singh AP, Wilson T, Kalk AJ, Cheong J, Vorsa N. Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. *Food Chem*. 2009;116(4):963-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.062

167. Azofeifa G, Quesada S, Boudard F, Morena M, Cristol J-P, Pérez AM, et al. Antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activities of phenolic compounds from tropical

- highland blackberry (*Rubus adenotrichos*). J Agric Food Chem. 2013;61(24):5798-804. doi: 10.1021/jf400781m
168. Dangles O, Fargeix G, Dufour C. Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion. J Chem Soc Perkin Trans 2. 2000;(8):1653-63. doi: 10.1039/B003260N
169. Faria A, Oliveira J, Neves P, Gameiro P, Santos-Buelga C, de Freitas V, et al. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. J Agric Food Chem. 2005;53(17):6896-902. doi: 10.1021/jf0511300
170. Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics--a Finnish perspective. Mol Nutr Food Res. 2007;51(6):684-91. doi: 10.1002/mnfr.200700006
171. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. J Agric Food Chem. 2002;50(1):166-71. doi: 10.1021/jf0108765
172. Ogawa K, Sakakibara H, Iwata R, Ishii T, Sato T, Goda T, et al. Anthocyanin composition and antioxidant activity of the Crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. J Agric Food Chem. 2008;56(12):4457-62. doi: 10.1021/jf800406v
173. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of vaccinium species. J Agric Food Chem. 1998;46(7):2686-93. doi: 10.1021/jf980145d
174. Sreejayan N, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. J Pharm Pharmacol. 1997;49(1):105-7. doi: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06761.x
175. Pergola C, Rossi A, Dugo P, Cuzzocrea S, Sautebin L. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. Nitric Oxide Biol Chem. 2006;15(1):30-9. doi: 10.1016/j.niox.2005.10.003
176. Cuevas-Rodríguez EO, Yousef GG, García-Saucedo PA, López-Medina J, Paredes-López O, Lila MA. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated mexican blackberries (*Rubus* spp.). J Agric Food Chem. 2010;58(12):7458-64. doi: 10.1021/jf101485r
177. Auger, C., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B. Vascular protection by grape derived polyphenols. Agro Food Industry Hi-Tech. 2009;20:38-40. doi: 10.1055/s-0030-1250737

178. Tokoudagba J-M, Auger C, Bréant L, N’Gom S, Chabert P, Idris-Khodja N, et al. Procyanidin-rich fractions from *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery. *J Ethnopharmacol.* 2010;132(1):246-50. doi: 10.1016/j.jep.2010.08.031
179. Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem.* 2004;11(10):1345-59. doi: 10.2174/0929867043365288
180. Oak M-H, Auger C, Belcastro E, Park S-H, Lee H-H, Schini-Kerth VB. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free Radic Biol Med.* 2018;122:161-70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018
181. Byun M-W. Effect of procyanidin C1 on nitric oxide production and hyperpolarization through Ca(2+)-dependent pathway in endothelial cells. *J Med Food.* 2012;15(11):1032-7. doi: 10.1089/jmf.2012.2297
182. Elisia I, Hu C, Popovich DG, Kitts DD. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem.* 2007;101(3):1052-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.060.
183. Määttä-Riihinen KR, Kähkönen MP, Törrönen AR, Heinonen IM. Catechins and procyanidins in berries of vaccinium species and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2005;53(22):8485-91. doi: 10.1021/jf0504081
184. Tabart J, Franck T, Kevers C, Pincemail J, Serteyn D, Defraigne JO, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chem.* 2012;131(4):1116-22. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.076
185. Wang H, Cao G, Prior RL. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J Agric Food Chem.* 1996;44(3):701-5. doi: 10.1021/jf950579y
186. Choi M-H, Shim S-M, Kim G-H. Protective effect of black raspberry seed containing anthocyanins against oxidative damage to DNA, protein, and lipid. *J Food Sci Technol.* 2016;53(2):1214-21. doi: 10.1007/s13197-015-2094-7
187. Colak N, Torun H, Gruz J, Strnad M, Šubrtová M, Inceer H, et al. Comparison of phenolics and phenolic acid profiles in conjunction with oxygen radical absorbing capacity (ORAC) in berries of *Vaccinium arctostaphylos* L. and *V. myrtillus* L. *Pol J Food Nutr Sci.*

2016;66:85-91. doi: 10.1515/pjfn-2015-0053

188. Ehlenfeldt MK, Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J Agric Food Chem.* 2001;49(5):2222-7. doi: 10.1021/jf0013656

189. Denev P, Ciz M, Ambrozova G, Lojek A, Yanakieva I, Kratchanova M. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* 2010;123(4):1055-61. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.061

190. Martín J, Kuskoski EM, Navas MJ, Asuero AG. Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. *Flavonoids - En: Flavonoids - From Biosynthesis to Human* doi: 10.5772/67718

191. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 1997;45(2):304-9. doi: 10.1021/jf960421t

192. Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem.* 2018;241:480-92. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117

193. Colon M, Nerin C. Role of catechins in the antioxidant capacity of an active film containing green tea, green coffee, and grapefruit extracts. *J Agric Food Chem.* 2012;60(39):9842-9. doi: 10.1021/jf302477y

194. Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(4):503-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016

195. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290-302. doi: 10.1021/jf0502698

196. Li S, Xu M, Niu Q, Xu S, Ding Y, Yan Y, et al. Efficacy of procyanidins against *in vivo* cellular oxidative damage: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE.* 2015;10(10):e0139455. doi: 10.1371/journal.pone.0139455

197. Seo BN, Ryu JM, Yun SP, Jeon JH, Park SS, Oh KB, et al. Delphinidin prevents hypoxia-induced mouse embryonic stem cell apoptosis through reduction of intracellular reactive oxygen species-mediated activation of JNK and NF- κ B, and Akt inhibition. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2013;18(7):811-24. doi: 10.1007/s10495-013-0838-2

198. Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. *PLoS ONE*. 2011;6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0026012
199. Saw CLL, Guo Y, Yang AY, Paredes-Gonzalez X, Ramirez C, Pung D, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food Chem Toxicol*. 2014;72:303-11. doi: 10.1016/j.fct.2014.07.038
200. Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic Res*. 2004;38(12):1311-20. doi: 10.1080/10715760400016105
201. Granado-Serrano AB, Angeles Martín M, Goya L, Bravo L, Ramos S. Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2 cells. *J Nutr Biochem*. 2009;20(2):115-24. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.12.006
202. Kim Y, Choi Y, Ham H, Jeong H-S, Lee J. Protective effects of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from defatted grape seeds on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food Chem*. 2013;137(1-4):136-41. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.006
203. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr*. 2009;101(7):931-40. doi: 10.1017/S0007114508169896
204. Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Kleszczyńska H. Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cell Mol Biol Lett*. 2012;17(2):289-308. doi: 10.2478/s11658-012-0010-y
205. Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 2002;227(5):321-9. doi: 10.1177/153537020222700504
206. Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S, Krishnan UM. Influence of membrane lipid composition on flavonoid-membrane interactions: Implications on their biological activity. *Prog Lipid Res*. 2015;58:1-13. doi: 10.1016/j.plipres.2014.11.002
207. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*.

- 1995;19(4):481-6. doi: 10.1016/0891-5849(94)00240-k
208. Zhu QY, Schramm DD, Gross HB, Holt RR, Kim SH, Yamaguchi T, et al. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clin Dev Immunol.* 2005;12(1):27-34. doi: 10.1080/17402520512331329514
209. Pervin M, Hasnat Md, Lee Y, Kim D, Jo J, Lim B. Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of grape skin anthocyanin (GSA). *Molecules.* 2014;19(7):9403-18. doi: 10.3390/molecules19079403
210. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(1):51-60. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00329-4
211. Tsuchiya H, Nagayama M, Tanaka T, Furusawa M, Kashimata M, Takeuchi H. Membrane-rigidifying effects of anti-cancer dietary factors. *BioFactors Oxf Engl.* 2002;16(3-4):45-56. doi: 10.1002/biof.5520160301
212. Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. Membrane effects of cocoa procyanidins in liposomes and Jurkat T cells. *Biol Res.* 2004;37(2):293-300. doi: 10.4067/s0716-97602004000200016
213. Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmiański J, Sarapuk J, Kleszczyńska H. Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophys.* 2011;6(1):58-67. doi: 10.1007/s11483-010-9175-y
214. Bonarska-Kujawa D, Cyboran S, Żyłka R, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Biological activity of blackcurrant extracts (*Ribes nigrum* L.) in relation to erythrocyte membranes. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1-13. doi: 10.1155/2014/783059
215. Suwalsky M, Vargas P, Avello M, Villena F, Sotomayor CP. Human erythrocytes are affected *in vitro* by flavonoids of *Aristotelia chilensis* (Maqui) leaves. *Int J Pharm.* 2008;363(1-2):85-90. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.07.005
216. Abram V, Berlec B, Ota A, Šentjurc M, Blatnik P, Ulrih NP. Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chem.* 2013;139(1-4):804-13. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.100
217. Martín C, Martínez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and

- free radicals. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(6):705-12. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00704-3
218. Olas B. Berry Phenolic Antioxidants - implications for human health? *Front Pharmacol.* 2018;9:78. doi: 10.3389/fphar.2018.00078
219. Shin M-O, Yoon S, Moon J-O. The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Arch Pharm Res.* 2010;33(1):167-73. doi: 10.1007/s12272-010-2239-1
220. Suttnar J, Másová L, Dyr JE. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 2001;751(1):193-7. doi: 10.1016/s0378-4347(00)00453-9
221. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;827(1):76-82. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.06.035
222. Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem.* 2002;50(12):3549-52. doi: 10.1021/jf020029h
223. Lotito SB, Actis-Goretta L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, et al. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(3):945-51. doi: 10.1006/bbrc.2000.3571
224. Stankovic MS, Curcic MG, Zizic JB, Topuzovic MD, Solujic SR, Markovic SD. Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci.* 2011;12(7):4190-205. doi: 10.3390/ijms12074190
225. Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. *BMC Complement Altern Med.* 2010;10:4-11. doi: 10.1186/1472-6882-10-55
226. Ramasamy S, Wahab N, Zainal Abidin N, Manickam S, Zakaria Z. Growth inhibition of human gynecologic and colon cancer cells by *Phyllanthus watsonii* through apoptosis

- induction. *PLoS One*. 2012;7(4):1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0034793
227. Afrin S, Giampieri F, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reborde-Rodríguez P, et al. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnol Adv*. 2020;38. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.011
228. Feng R, Ni H-M, Wang SY, Tourkova IL, Shurin MR, Harada H, et al. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J Biol Chem*. 2007;282(18):13468-76. doi: 10.1074/jbc.M610616200
229. He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2010;1:163-87. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100754
230. Lizarraga D, Lozano C, Briedé JJ, Delft JH van, Touriño S, Centelles JJ, et al. The importance of polymerization and galloylation for the antiproliferative properties of procyanidin-rich natural extracts. *FEBS J*. 2007;274(18):4802-11. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06010.x
231. Mazewski C, Liang K, Gonzalez de Mejia E. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. *Food Chem*. 2018;242:378-88. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.086
232. Koosha S, Alshawsh MA, Looi CY, Seyedan A, Mohamed Z. An Association Map on the Effect of Flavonoids on the Signaling Pathways in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci*. 2016;13(5):374-85. doi: 10.7150/ijms.14485
233. Kang S-Y, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in *Apc(Min)* mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett*. 2003;194(1):13-9. PMID: 12706854
234. Lazzè MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*. 2004;25(8):1427-33. doi: 10.1093/carcin/bgh138
235. Malik M, Zhao C, Schoene N, Guisti MM, Moyer MP, Magnuson BA. Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer*. 2003;46(2):186-96. doi: 10.1207/S15327914NC4602_12

236. Anwar S, Fratantonio D, Ferrari D, Saija A, Cimino F, Speciale A. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation. *Mol Med Rep.* 2016;14(2):1397-403. doi: 10.3892/mmr.2016.5397
237. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2006;54(25):9329-39. doi: 10.1021/jf061750g
238. McDougall GJ, Ross HA, Ikeji M, Stewart D. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2008;56(9):3016-23. doi: 10.1021/jf073469n
239. Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, et al. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005;26(7):1291-5. doi: 10.1093/carcin/bgi074
240. Kaur M, Singh RP, Gu M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits *in vitro* and *in vivo* growth of human colorectal carcinoma cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 1):6194-202. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1465
241. Yi W, Fischer J, Krewer G, Akoh CC. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J Agric Food Chem.* 2005;53(18):7320-9. doi: 10.1021/jf051333o
242. Minker C, Duban L, Karas D, Järvinen P, Lobstein A, Muller CD. Impact of procyanidins from different berries on caspase 8 activation in colon cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:1-13. doi: 10.1155/2015/154164
243. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 2003;10(6-7):499-503. doi: 10.1078/094471103322331458
244. Adams L, Phung S, Yee N, Seeram N, Li L. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res.* 2010;70(9):3594-605. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-09-3565

245. Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Vieira MN, Rodríguez-Werner MA, Schmalfluss E, Winterhalter P, et al. Phenolics from the Patagonian currants *Ribes* spp.: Isolation, characterization and cytoprotective effect in human AGS cells. *J Funct Foods*. 2016;26:11-26. doi: 10.1016/j.jff.2016.06.036

246. Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Ávila F, Thomas-Valdés S, Mardones C, von Baer D, et al. The Chilean wild raspberry (*Rubus geoides* Sm.) increases intracellular GSH content and protects against H₂O₂ and methylglyoxal-induced damage in AGS cells. *Food Chem*. 2016;194:908-19. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.117

247. Shih P-H, Yeh C-T, Yen G-C. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2005;43(10):1557-66. doi: 10.1016/j.fct.2005.05.001

248. Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, et al. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(4):701-7. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.12.085

249. Engelbrecht A-M, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, Smith R, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Lett*. 2007;258(1):144-53. doi: 10.1016/j.canlet.2007.08.020

250. Esselen M, Fritz J, Hutter M, Teller N, Baechler S, Boettler U, et al. Anthocyanin-rich extracts suppress the DNA-damaging effects of topoisomerase poisons in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55 Suppl 1:S143-153. doi: 10.1002/mnfr.201000315

251. Curti V, Di Lorenzo A, Dacrema M, Xiao J, Nabavi SM, Daglia M. In vitro polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. *Semin Cancer Biol*. 2017;46:119-31. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.08.005

252. Sak K. Characteristic features of cytotoxic activity of flavonoids on human cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(19):8007-19. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.19.8007

253. Cvorovic J, Tramer F, Granzotto M, Candussio L, Decorti G, Passamonti S. Oxidative

stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. *Arch Biochem Biophys.* 2010;501(1):151-7. doi: 10.1016/j.abb.2010.05.019

254. Nandakumar V, Singh T, Katiyar SK. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett.* 2008;269(2):378-87. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.049

255. Jo J-Y, Gonzalez de Mejia E, Lila MA. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II by interactions of grape cell culture polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2006;54(6):2083-7. doi: 10.1021/jf052700z

256. Habermeyer M, Fritz J, Barthelmes HU, Christensen MO, Larsen MK, Boege F, et al. Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(9):1395-404. doi: 10.1021/tx050039n

RESEARCH REPORT *Bactris guineensis* (Arecacea) extract: polyphenol characterization, antioxidant capacity and cytotoxicity in cancer cell lines. Journal of Berry Research. 2020

Research Report

Bactris guineensis (Arecaceae) extract: polyphenol characterization, antioxidant capacity and cytotoxicity against cancer cell lines

María S. Quesada^{a,b,*}, Gabriela Azofeifa^a, Luca Campone^c, Imma Pagano^d, Ana M. Pérez^e, Carolina Cortés^e, Luca Rastrelli^d and Silvia Quesada^a

^aBiochemistry Department, School of Medicine, University of Costa Rica, San José, Costa Rica

^bPharmacy Faculty, University of Costa Rica, San José, Costa Rica

^cDepartment of Agriculture, Food Chemistry, University Mediterranea of Reggio Calabria, Reggio Calabria, Italy

^dPharmacy Department, University of Salerno, Fisciano, Italy

^eNational Center of Food Science and Technology (CITA), University of Costa Rica, San José, Costa Rica

Received 25 June 2019; accepted 19 January 2020

Abstract.

BACKGROUND: Lower risk of digestive tract cancer development has been associated with polyphenol intake. *Bactris guineensis* is an edible endemic palm that grows in Central and South America.

OBJECTIVE: This study performs a phenolic characterization of *Bactris guineensis* and evaluates the bioactivity of this fruit.

METHODS: The phenolic compounds of *B. guineensis* were characterized by HPLC-UV-HRMS analyses and the antioxidant activity was measured by chemical and cellular methods. Additionally, cytotoxicity of *B. guineensis* polyphenols was performed on 4 cancer cell lines and the pro-apoptotic effect was evaluated by flow cytometry using annexin staining.

RESULTS: The major phenolic compounds of *B. guineensis* were proanthocyanidins. The extract IC₅₀ for DPPH was 3.3 ± 0.2 µg/mL and for induced intracellular ROS was 153 ± 13 µg/mL. MTT cytotoxic assays demonstrate IC₅₀ values between 16.6 and 24.9 µg/mL for the colon and hepatic adenocarcinomas, with high selectivity effects towards cancer cells compared to non-tumor cells. A 20 to 50% early apoptotic effect was observed in cancer cells lines by Annexin/PI staining.

CONCLUSIONS: *B. guineensis* evidenced an important radical scavenging activity and a strong cytotoxic activity against hepatic and colorectal carcinoma cells, showing better values than procyanidin extracts from other fruits previously described.

Keywords: *Bactris guineensis*, antioxidant, polyphenols, apoptosis, cytotoxicity, procyanidins

*Corresponding author: María S. Quesada, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, Campus Rodrigo Facio, 2060, San José, Costa Rica. Tel.: +506 2511 8345; E-mail: maria.quesada@ucr.ac.cr.