

# Evaluación del contenido de azúcares y polifenoles del extracto de *Vaccinium meridionale* en diferentes medios etanólicos para el estudio de su actividad antioxidante y antitumoral

Proyecto para la obtención de grado en Química

## Isabella Monroy Bustos

Directora:

Elizabeth Jiménez Díaz Ph.D.

**Palabras clave:** *Vaccinium meridionale*, compuestos polifenólicos, actividad antioxidante, actividad antitumoral.

Departamento de Química

Facultad de ciencias

Universidad de los Andes

Diciembre de 2021

# Contenido

Introducción .....	4
Objetivos .....	7
General .....	7
Específicos .....	7
Métodos .....	8
Obtención y preparación de la muestra .....	8
Extracción asistida por microondas .....	8
Determinación del porcentaje de azúcares .....	8
Disminución de la cantidad de azúcares .....	9
Determinación de contenido de polifenoles totales .....	9
Actividad antioxidante .....	10
Cultivo celular .....	11
Secado del extracto .....	11
Pruebas de actividad antitumoral .....	11
Análisis de datos .....	12
Análisis y discusión de resultados .....	13
Determinación del porcentaje de azúcares .....	13
Cuantificación de polifenoles totales .....	15

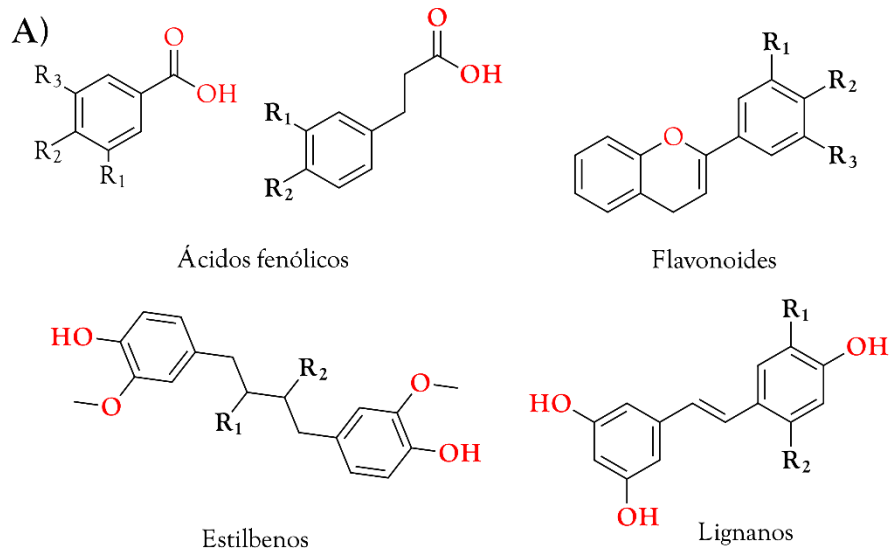
Actividad antioxidante .....	20
Actividad antitumoral .....	21
Conclusiones .....	25
Referencias.....	27

## Introducción

El consumo de infusiones, jugos o cocidos de plantas ha sido una práctica común y constante en varias culturas durante las diferentes eras de la humanidad. Aún con la llegada de la medicina moderna, los “remedios tradicionales” son de gran importancia en el cuidado de la salud, e incluso cobran relevancia como tradición en la sociedad colombiana de hoy día<sup>1</sup>. Uno de los frutos al que se le atribuyen con frecuencia propiedades benéficas es el agrás, baya del arbusto *Vaccinium meridionale*. Esta planta prolifera en el clima propio de la región Andina entre 2200 y 3400 metros sobre el nivel del mar, con la particularidad de que en Colombia presenta dos épocas de cosecha anuales<sup>1-3</sup>.

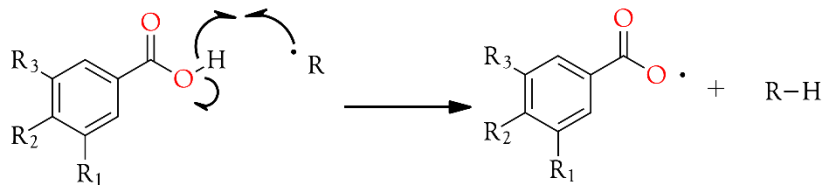
Precisamente, las propiedades que se le atañen a este fruto son antioxidantes y anticancerígenas<sup>1,3</sup>, razón por la que su estudio es de gran interés en diversos campos de las ciencias químicas. Estas propiedades medicinales también se les ha sido atribuidas a otras bayas como: uvas<sup>4</sup>, endrino<sup>5</sup>, mora azules<sup>6</sup>, entre otras. Frecuentemente estas características han sido justificadas por la presencia de compuestos polifenólicos que, en los extractos de las bayas, han probado ser antioxidantes efectivos, y potenciales agentes antibacteriales y anticancerígenos<sup>7-9</sup>.

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes en una amplia variedad de plantas, en estos organismos cumplen funciones variadas no esenciales, como moléculas señalizadores y como defensa ante predadores y patógenos<sup>10</sup>. Dentro de los componentes originarios de las plantas, estos son los más abundantes y variados. Estructuralmente los caracteriza la presencia de uno o varios anillos fenólicos, y su variedad estructural los subdivide en categorías, como lo son los flavonoides o los ácidos fenólicos<sup>11</sup> (**Figura 1 A**). Las propiedades antioxidantes de este tipo de compuestos se explican de dos maneras: por su facilidad de donar un hidrógeno radical y estabilizar en su estructura aromática al radical que resulta en la molécula polifenólica<sup>10,12</sup>, y por su capacidad de quelación de metales<sup>13</sup> (**Figura 1 B**).

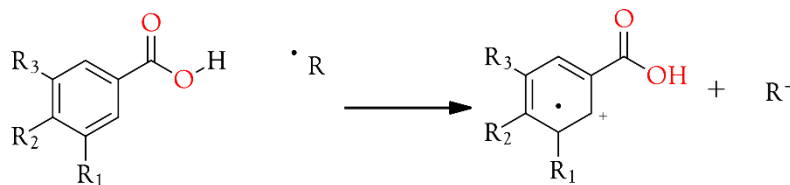


B)

Transferencia de átomo de Hidrógeno



Transferencia de un sólo electrón



Quelación de metales

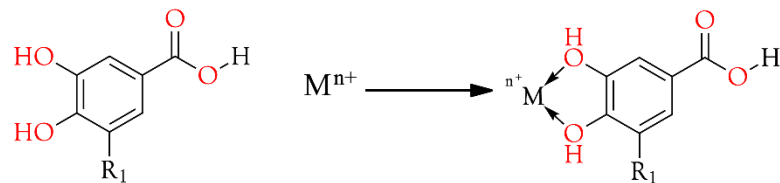


Figura 1: A: Estructura de distintos tipos de polifenoles B: mecanismos de actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los polifenoles, y por consecuencia de los extractos que los contienen, es de gran interés. Principalmente su función consiste en neutralizar radicales libres producidos por distintos procesos biológicos como la reducción de oxígeno molecular mediante mecanismos

altamente energéticos, transferencia de electrones, entre otros procesos<sup>10,12</sup>. El uso de antioxidantes se presenta en varios campos: en la salud como agente preventivo de distintas patologías dentro de las que se encuentran las afecciones cardíacas, la neurodegeneración y el cáncer<sup>14</sup>, en la industria cosmética como ingredientes principales en la formulación de productos para contrarrestar el proceso del envejecimiento<sup>15</sup>, y en la industria alimentaria pues muchos de los preservantes que se usan son compuestos con el fin de evitar el estrés oxidativo<sup>12</sup>. La actividad antioxidante de los polifenoles junto con la actividad antitumoral que se ha evidenciado en algunos extractos frutales que los contienen<sup>9</sup> abre las puertas al estudio de estos como terapia anticancerígena, e incluso al consumo de dichas frutas como parte de una dieta terapéutica.

De manera que el estudio de los frutos que contengan polifenoles cobra relevancia, particularmente en frutos endémicos como lo son los de *Vaccinium meridionale*. Extractos de este fruto han sido estudiados recientemente por López-Padilla y colaboradores<sup>16</sup>. En este estudio encontraron un contenido fenólico total de 51 g equivalentes al ácido gálico kg<sup>-1</sup>. En cuanto a su actividad antitumoral, han sido estudiados los extractos acuosos por Maldonado y colaboradores<sup>17</sup> encontrando un IC<sub>50</sub> de 59.12 µg/mL para células de adenocarcinoma de colon.

Por otro lado, en trabajos previos del grupo de investigación, Gaviria optimizó la extracción de polifenoles de esta fruta en una mezcla agua/etanol asistida por microondas<sup>18</sup>. En este trabajo también se estudiaron las propiedades antioxidantes del extracto obtenido. Sin embargo, al probar la actividad antibacteriana se encontraron resultados contrarios a los esperados, por lo cual Gaviria postuló que la presencia de azúcares pudo enmascarar la posible actividad antibacteriana del extracto.

Continuando con este estudio, se busca analizar también la actividad antitumoral de los extractos. Sin embargo, es importante notar la posible interferencia con azúcares que se mencionó anteriormente, pues al ser la glucosa parte de los insumos para el crecimiento celular, puede ser fuente de interferencia en el estudio. De manera que se realizará una revisión del protocolo anteriormente trabajado con el fin de minimizar la incidencia de los azúcares en los ensayos biológicos propuestos en este proyecto para evaluar la actividad antitumoral. Posteriormente se reevaluará la cantidad de polifenoles extraídos, su actividad antioxidante y finalmente su actividad anticancerígena.

## Objetivos

### General

Evaluar la presencia de azúcares y polifenoles en el extracto de *Vaccinium meridionale* para la evaluación de sus actividades antioxidante y antitumoral en la línea de cáncer colorrectal HCT-116.

### Específicos

- Determinar la cantidad de azúcares presente en los extractos etanólicos de agrás.
- Ajustar la metodología de la extracción etanólica asistida por microondas con el fin de reducir la cantidad de azúcares en el extracto.
- Comparar los métodos Folin-Ciocalteu y Azul de Prusia para la cuantificación de polifenoles totales en el extracto etanólico de agrás.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos a partir del ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox.
- Evaluar la actividad antitumoral de los extractos en la línea celular HTC-116 mediante el ensayo de viabilidad MTT.

## Métodos

### Obtención y preparación de la muestra

La muestra se obtuvo de la Central de Abastos de Bogotá D.C., los frutos originan de distintas regiones del país: Boyacá, Cauca y Antioquia. Las muestras fueron lavadas con agua Tipo 1 y posteriormente se seleccionaron los frutos maduros. Las muestras se secaron haciendo cuatro ciclos de 24 horas liofilización y 24 horas congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , bañándolas antes con nitrógeno líquido. Las frutas fueron homogenizadas con un molino *Pulverisette 15 (Fritsch)* y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Extracción asistida por microondas

La obtención del extracto se realizó usando un reactor de microondas *CEM Discover SP*, por 5 minutos, a  $110^{\circ}\text{C}$ . El extracto se obtuvo a partir de 58mg de muestra seca molida en 2mL de disolvente (etanol 30, 40 y 50%). Las condiciones del reactor de microondas fueron tomadas directamente de la optimización realizada por Gaviria<sup>18</sup>. La proporción de disolventes se evaluó a partir de la optimizada por Gaviria<sup>18</sup> teniendo en cuenta la cantidad de polifenoles obtenidos, y el porcentaje de azúcares.

### Determinación del porcentaje de azúcares

Para la cuantificación de los azúcares presentes en el extracto se realizaron pruebas de Benedict, Barfoed y finalmente se utilizó un refractómetro de Brix. La prueba de Benedict comienza con la preparación del reactivo de Benedict, mezclando 0.17g de sulfato de cobre pentahidratado, 1.00g de carbonato de sodio y 1.73g de citrato de sodio en un volumen de 10mL de agua<sup>19</sup>. La prueba se realiza mezclando 500 $\mu\text{L}$  de la muestra con 1000 $\mu\text{L}$  del reactivo. La prueba de Barfoed se realiza de manera similar; el reactivo de Barfoed se prepara mezclando 0.65g de acetato de cobre y 0.10mL de ácido acético glacial, aforando finalmente a 10mL con agua<sup>20</sup>. La prueba de Barfoed se realizó mezclando 200  $\mu\text{L}$  de la muestra con 200 $\mu\text{L}$  del reactivo de Barfoed.

En el caso de estas dos primeras pruebas, se realizaron mediciones utilizando una solución de glucosa al 40%p/v, así como la muestra de extracto etanólico de agrás y dos puntos más de la muestra a diluciones de 1:2 y 1:5. Con el fin de confirmar la interferencia de los polifenoles presentes en la



muestra, también se realizaron mediciones utilizando la prueba de Benedict y la prueba de Barfoed en soluciones de pirogalol a concentraciones distintas desde 0,075% hasta 30%p/v.

Por otro lado, para la cuantificación de azúcares utilizando el refractómetro de Brix se realizaron tres curvas de calibración cada una con seis puntos de glucosa entre 1% y 40%p/v. Cada curva de calibración se realizó en una mezcla etanólica: la primera en 30% de etanol, la segunda en 40% y la tercera en 50%. Esto con el fin de tener en cuenta la interferencia de la matriz de extracción a la hora de cuantificar los azúcares. Adicionalmente, se realizaron medidas utilizando 0.5mM y 20mM de pirogalol con una concentración constante de glucosa al 16%p/v con el fin de descartar la interferencia de polifenoles en este método. Las mediciones se realizaron por triplicado para el análisis estadístico.

### **Disminución de la cantidad de azúcares**

Con el fin de disminuir la cantidad de azúcares disueltos en la extracción se estudiaron diferentes proporciones de etanol en la solución de extracción: 30%, 40% y 50%, siendo esta proporción la única variación del método de extracción optimizado por Gaviria<sup>18</sup> como fue descrito anteriormente. Para cada una de las tres soluciones etanólicas se midió el porcentaje de azúcares según el grado Brix obtenido y la cantidad total de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu.

### **Determinación de contenido de polifenoles totales**

La cuantificación de polifenoles se realizó utilizando dos protocolos distintos con el fin de compararlos: el reactivo de Folin- Ciocalteu y la síntesis de Azul de Prusia. El primer protocolo que se siguió fue el descrito por Ainsworth<sup>21</sup> usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se tomaron 100µL de la solución de estándar, muestra o blanco, a esto se agregaron 200µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido previamente 1:10. Esta mezcla se somete a vórtex y posteriormente se agregaron 800µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 700mM. Se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos. De estas soluciones se tomaron 100µL y se transfirieron a placas de 96 pozos por triplicado. A cada punto se le adicionaron 100µL de agua Tipo 1 y finalmente se midió la absorbancia a 765nm en el espectrofotómetro *Multiskan go* (ThermoScientific USA).

El procedimiento seguido para la cuantificación de polifenoles por síntesis de azul de Prusia fue el descrito por Pueyo<sup>22</sup>. En él se toman 100µL de la solución a medir (muestra, solución de estándar o blanco) y se mezclan con 100µL de FeCl<sub>3</sub> 0.04mM en HCl 0.01N, luego se agregan 100µL de ferricianuro de potasio 0.36mM. Esta mezcla se dejó incubar por 15 minutos y se midió la absorbancia a 725nm en el espectrofotómetro *Multiskan go* (ThermoScientific USA).

Ambos métodos se compararon respecto a su linealidad, límites de detección y cuantificación y sensibilidad a la interferencia de los azúcares. Para las tres primeras características se realizaron curvas de calibración en diversos rangos de concentración hasta encontrar un ajuste R<sup>2</sup> mayor a 0.97, entonces se verificaron los límites de detección y cuantificación. Con el fin de observar la respuesta de los métodos frente a azúcares se realizó una curva de glucosa de 0% a 40% p/v.

El método finalmente usado para cuantificar fue el de Folin-Ciocalteu con un rango lineal entre 0.01 y 2mM. Para la cuantificación de polifenoles se realizó una curva de calibración en estas concentraciones y se midió la muestra en una dilución 1:20.

### **Actividad antioxidante**

En cuanto a la medición de la actividad antioxidante, se realizó el ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) con el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)• (ABTS)<sup>23</sup>. En este ensayo se preparó el radical ABTS• mezclando 5mL de una solución 7.3 mM de ABTS y 5mL de una solución K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2.4mM, esta mezcla se dejó incubar de 12 a 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se diluyó la solución hasta que la absorbancia de esta fue de 0.74±0.03 a 734nm. Para la determinación de la actividad antioxidante del extracto se preparó una curva de calibración de Trolox entre 0.1 y 1 mM en EtOH50%. Así, a 200 µ L de la solución del radical se agregaron 10 µ L de solución estándar, extracto o blanco, se permitió que reaccionara por 7 minutos en la oscuridad y finalmente se midió la absorbancia a 734 nm en el espectrofotómetro *Multiskan go* (ThermoScientific USA).

## **Cultivo celular**

La línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 (ATCC, USA) se tuvo en cultivo a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 (*Sigma Aldrich, USA*) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1 % de solución de antibiótico PS. La manipulación de la línea celular HCT-116 se realizó en una cabina de flujo celular *Airstream*® Clase II (*ThermoFisher Scientific, USA*). El ensayo con el extracto se realizó con las células en fase de crecimiento exponencial.

## **Secado del extracto**

Con el fin de eliminar el etanol para la prueba de actividad antitumoral se retiró la mezcla de extracción por medio del concentrador completo *Centriva*®<sup>TM</sup> (*Labconco*). El proceso de retirar el solvente tomó 6 horas, a una temperatura de 20 °C con trampa de vacío.

## **Pruebas de actividad antitumoral**

La evaluación de la actividad biológica contra la línea celular se realizó por medio del ensayo MTT. Se usó un protocolo de disociación estándar establecido por el grupo de investigación<sup>24</sup>. Brevemente, las células se sembraron a una concentración de 1x10<sup>4</sup> células por pozo en un plato de 96 pozos y se permitió adhesión celular durante la noche. Posteriormente, se agregó el extracto desde concentración de 0.1 µg/mL a 10000 µg/mL para los pozos de tratamientos, para los pozos de control positivo se agregó una solución de doxorrubicina para tener una concentración final de 250 µM y para el control negativo se agregó medio de cultivo. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se dejó un periodo de incubación de 72 horas. Adicionalmente, se tomó un control de Crecimiento T<sub>0</sub> a las 24 horas de agregar las células en los pozos. Finalizados los respectivos tiempos de incubación, se agregaron 40 µL de una solución de MTT de 1 mg/mL y se incubó por 3 horas. Luego, el plato se centrifugó a 2000 RPM por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 µL de DMSO en cada pozo para solubilizar los cristales morados de formazán. Se incubó entonces la placa a 37 °C por 10 minutos y se midió la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro *Multiskan Go* (*ThermoScientific, USA*). El tratamiento de estos datos para porcentaje de viabilidad celular se hizo con el protocolo descrito por Melo<sup>25</sup>.

## **Análisis de datos**

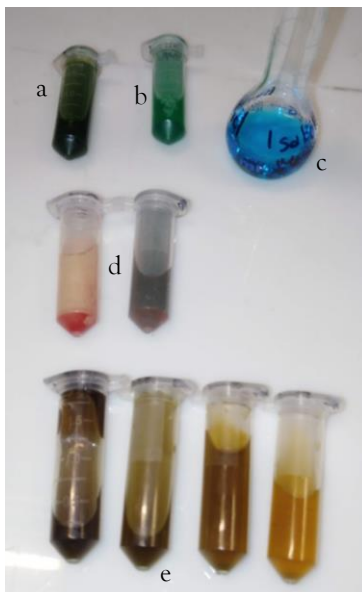
El análisis de regresión lineal correspondiente las diferentes curvas de calibración, la cuantificación basada en estas curvas, el ANOVA y la construcción de la curva dosis-respuesta del ensayo MTT se realizaron con el *software* de libre acceso R.

## Análisis y discusión de resultados

### Determinación del porcentaje de azúcares

La primera aproximación realizada para la cuantificación de azúcares fueron los métodos colorimétricos de Barfoed y Benedict. Estos métodos se basan en la capacidad reductora de la glucosa y son de naturaleza cualitativa<sup>19,20</sup>, por lo cual inicialmente se realizó un ensayo preliminar para observar el comportamiento de estos métodos frente al extracto. En el ensayo con el reactivo de Benedict se esperaba la producción de un precipitado rojo correspondiente a óxido de cobre formado por la acción reductora de los azúcares, mientras que en las soluciones que contenían pirogalol se esperaba un resultado negativo donde la solución mantuviese el color azul del cobre II. Sin embargo, el resultado en las soluciones con el polifenol no fue el esperado, pues se formó una suspensión café oscura/parda, que se puede apreciar en la **Figura 2**, en todo rango de concentraciones que se probó para el pirogalol. De manera que este resultado también se presentó al hacer la prueba en las muestras de extracto, aún a distintas diluciones no se pudo observar la formación de un precipitado rojo, y en vez se vio un compuesto oscuro también mostrado en la **Figura 2**. Análogamente, la prueba de Barfoed, basada también en la reducción de cobre II para formar el precipitado rojo de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , resultó en la formación de una sustancia aún más opaca. De manera que estas pruebas preliminares no fueron concluyentes con respecto al contenido de azúcares de las muestras y se decidió hacer uso de un método basado en la refracción que será descrito más adelante.

Esta sustancia marrón correspondería a la oxidación de los polifenoles, el cual es un proceso común, incluso presente en la naturaleza en el proceso de empardecimiento por el que pasan los alimentos al comenzar su degradación resultando en la formación de quinonas de colores marrones<sup>26</sup>. De esta manera, las pruebas de azúcares que involucren la capacidad reductora de los azúcares como mecanismo de detección no son adecuadas en una matriz con polifenoles que pudiesen actuar como reductores más prominentes. De hecho, esto se puede contrastar con los potenciales de oxidación del pirogalol:  $0.59\text{V}$ <sup>27</sup> y de la glucosa:  $-0.35\text{V}$ <sup>28</sup>. Partiendo de esto, se descartaron los métodos que involucraran el potencial reductor de los azúcares como reacción indicativa de su presencia.



*Figura 2 a. Prueba con la muestra sin diluir b. Prueba con una dilución 1/5 de la muestra c. Reactivo de Benedict d. prueba con glucosa 1% y con 0.2% glucosa f. Pruebas con pirogalol.*

Por tanto, se decidió recurrir a otra propiedad de los azúcares para su cuantificación. El índice de Brix es una medida usada en todo tipo de matrices para cuantificar los sólidos disueltos en una sustancia gracias al cambio que estos provocan en el índice de refracción del líquido. Dentro de la información que se puede conocer por la medición del índice de Brix están los azúcares y la proporción de alcohol.

Así, se realizó la cuantificación de los azúcares presentes en los extractos obtenidos con 30%, 40% y 50% de etanol con el fin de comparar estos resultados y seleccionar aquel porcentaje en el que se obtuviera la cantidad óptima de polifenoles y la menor cantidad de azúcares. Los porcentajes de etanol a probar se seleccionaron primero en valores cercanos al optimizado por Gaviria<sup>18</sup>, que fue 40%; a partir de allí se evaluaron las proporciones de 30 y 50% de etanol, partiendo del cambio que tiene la solubilidad de los azúcares en diferentes porcentajes de etanol<sup>29</sup>. Posterior a la cuantificación de los azúcares se estudió el efecto que tiene el cambio de mezcla de disolvente en la cantidad de polifenoles extraídos, esto se discutirá en la próxima sección. Para los extractos en las tres diferentes proporciones de etanol el índice de Brix obtenido estuvo por debajo de los límites de cuantificación del método en cada una de las curvas de calibración realizadas, lo que indica que la cantidad de

azúcares es menor a estos valores (9.2, 4.4 y 4.4% para las curvas realizadas en 30, 40 y 50% de etanol respectivamente) y por tanto no se puede asegurar su cantidad con certeza. Se debe tener en cuenta que, en este caso, se cuenta con una limitación del método por la interferencia del etanol en el solvente de extracción como se mencionó anteriormente. No obstante, teniendo en cuenta los factores de dilución empleados por Gaviria<sup>18</sup> para las pruebas antibióticas, a partir de los resultados obtenidos por el método de Brix se concluye que la cantidad de azúcares del extracto no es la causante de la ausencia de actividad antibiótica vista en estos ensayos. De lo anterior se puede plantear que otra posible causa está asociada a los rangos de concentración de las pruebas, que se vieron limitados por la cantidad de etanol tolerada por el cultivo bacteriano. De otros estudios, se observa que los rangos de concentración de los ensayos para la actividad antibiótica eran mayores<sup>30</sup> con respecto a los probados por Gaviria<sup>18</sup>. Por lo tanto, una opción para realizar ensayos a mayores concentraciones es retirar el solvente del extracto para de esa forma disolverlo en un medio con mayor tolerancia para el cultivo, permitiendo manejar concentraciones mayores del extracto.

### **Cuantificación de polifenoles totales**

Con el fin de cuantificar los polifenoles totales del extracto se usaron dos ensayos: Azul de Prusia y Folin-Ciocalteu. Ambos son métodos colorimétricos que involucran la formación de una sustancia coloreada a partir de la presencia de agentes reductores (particularmente en este caso los polifenoles). Precisamente por este principio basado en la actividad reductora de la muestra es que se decidió estudiar la respuesta de estos métodos también frente a la presencia de azúcares reductores, probablemente presentes en la matriz de el extracto de agrás. Teniendo en cuenta también que se habían encontrado reportes de falsos positivos con azúcares reductores en el método Folin-Ciocalteu<sup>31</sup>, se eligió compararle con el de Azul de Prusia; y ambos métodos se probaron frente a glucosa y frente a pirogalol.

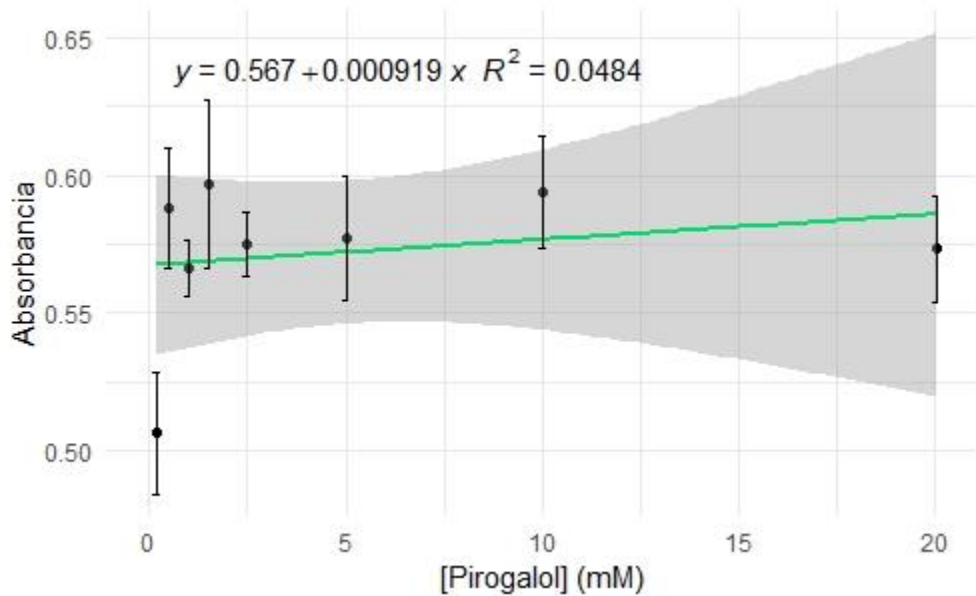


Figura3: Curva de calibración del con el ensayo de Azul de Prusia

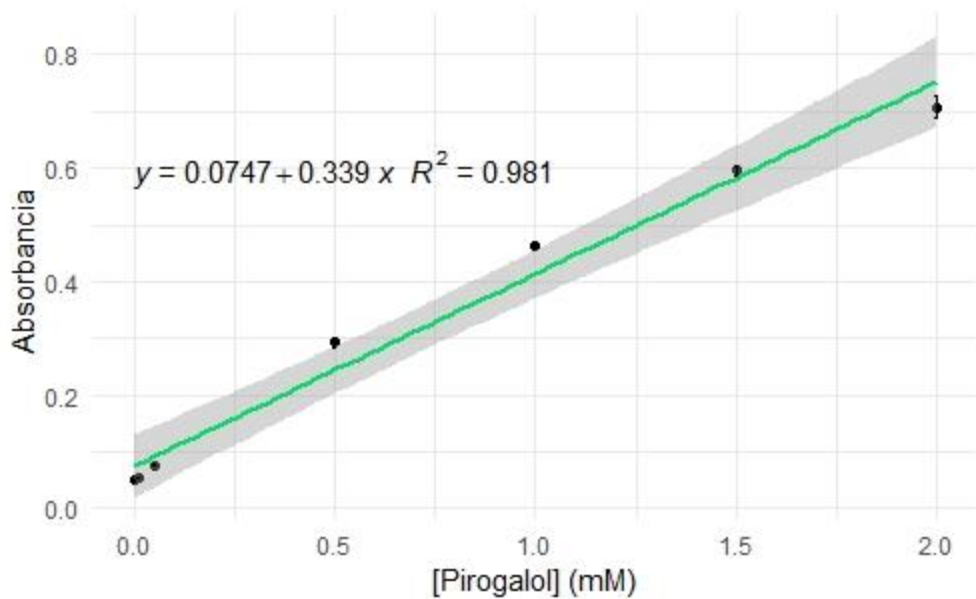


Figura4: Curva de calibración de pirogalol con el método de Folin-Ciocalteu

Se realizaron curvas de calibración con pirogalol en ambos métodos en rangos de 0.2 a 20mM con 8 puntos de concentración con el fin de hallar el rango en que cada método es lineal. En el caso del método de azul de Prusia no se encontró ningún rango de linealidad **Figura 3** por lo que no se siguió



su análisis como método de cuantificación de polifenoles. Por el contrario, para el método de Folin-Ciocalteu se encontró linealidad en el rango de 0.2 a 2mM **Figura 4**, y con un límite de detección de 0.0401mM y un límite de cuantificación de 0.1339mM.

Respecto a la respuesta de cada uno de los métodos frente a concentraciones de azúcares se obtuvo que en la curva realizada variando la concentración de glucosa únicamente, el método de Azul de Prusia **Figura 5** respondía de manera no lineal a la concentración de azúcares, mientras que la respuesta de las medidas con el reactivo de Folin-Ciocalteu, aunque fue lineal, fue mucho menos sensible **Figura 6**. De manera que se descartó por completo el uso del método de azul de Prusia para la cuantificación del contenido polifenólico total y se usó para la cuantificación el método de Folin-Ciocalteu.

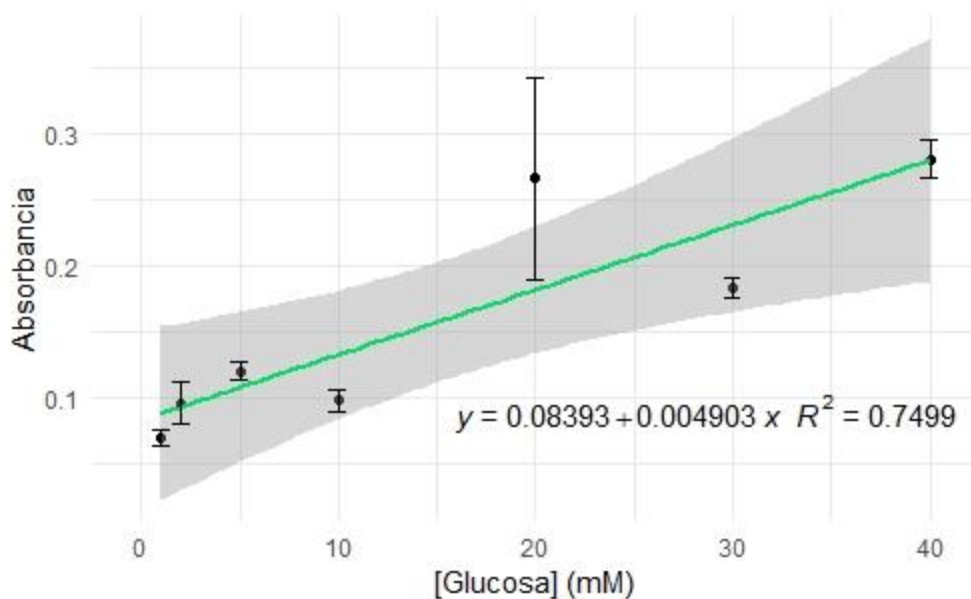


Figura 5: Efecto de la concentración de glucosa en el método de Azul de Prusia

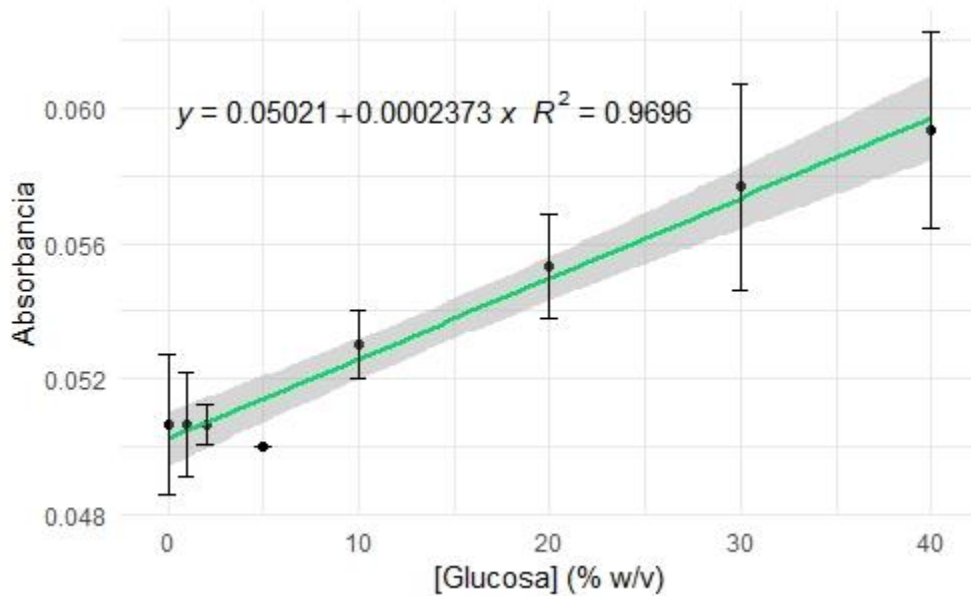


Figura6: Efecto de la concentración de glucosa en el método de Folin -Ciocalteu

Así, se cuantificó el contenido polifenólico del extracto en dos diferentes instancias: en la comparación de porcentaje de etanol usado para las extracciones, y después del secar el extracto y disolver 2mg del resultante en 300µL 10% DMSO. En primer lugar, en la **Figura 7** se muestra la comparación de los resultados de la cuantificación de polifenoles totales del extracto realizado en diferentes proporciones de etanol:30, 40 y 50%. En este caso se obtuvieron valores de  $6.50 \pm 0.02$ ,  $6.65 \pm 0.02$  y  $6.78 \pm 0.01$  mM equivalentes a pirogalol respectivamente, no se define una diferencia significativa entre los contenidos polifenólicos obtenidos en las diferentes proporciones de etanol. Sin embargo, se establece como la proporción etanólica más adecuada para la extracción de polifenoles del agrás, evitando la extracción de azúcar, la solución etanólica de 50% a partir de los resultados obtenidos en la cuantificación de azúcares y la cuantificación de polifenoles.

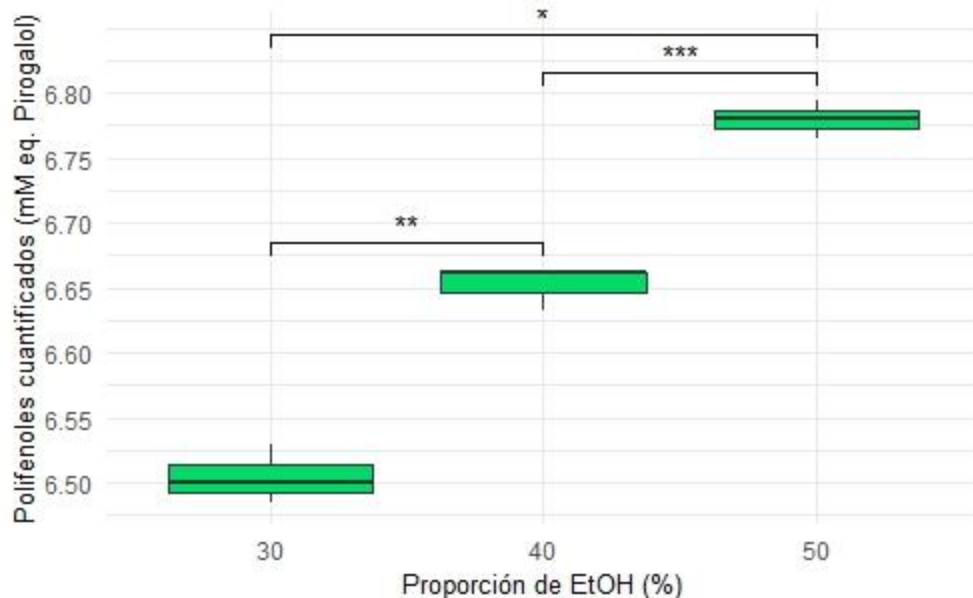


Figura 7: ANOVA para la comparación de la cantidad total de polifenoles (mM eq. a Pirogalol) en el extracto de agrás por proporción de etanol. Nivel de significancia: 0.05 (\*), 0.01(\*\*), 0.001(\*\*\*)

Siguiente, se realizó la cuantificación de la solución obtenida al redisolver en 300µL de 10% DMSO 2mg del sólido obtenido al secar en frío el extracto realizado con 50% de etanol. Esto pues debía eliminarse tanto como fuera posible el disolvente etanol para realizar las pruebas biológicas posteriores, y para estas pruebas se debe tener en cuenta la concentración de los polifenoles, las cuales son las moléculas a las que se les atribuyen la actividad antioxidante y antitumoral<sup>32</sup>. De esta manera se cuantificaron los polifenoles presentes en la solución obtenida por el método de Folin-Ciocalteu, dando como resultado  $3.19 \pm 0.03$  mM equivalentes a pirogalol. Al ser el estándar usado pirogalol y no ácido gálico como es común en la cuantificación de polifenoles totales, es difícil hacer una comparación entre los resultados de cuantificación de polifenoles obtenidos en este trabajo con la literatura, sin embargo, si es posible realizar una comparación desde la actividad antioxidante y antitumoral que se discutirán en las próximas secciones.

## Actividad antioxidante

La actividad antioxidante medida a partir del ensayo TEAC con el radical ABTS, al igual que la cuantificación de polifenoles, se obtuvo en dos etapas distintas del tratamiento del extracto: previo y posterior al secado. En el caso del primero, se analizó el extracto de agrás obtenido con 50% de etanol y se tuvo en cuenta una solución de 50% etanol para descartar esta mezcla como falso positivo. Este análisis dio como resultado una actividad antioxidante de  $1.25 \pm 0.01$  mM equivalentes al Trolox. Sin embargo, cabe mencionar que se esperaba una actividad mucho menor, por lo que este valor fue cuantificado con una curva de calibración realizada entre 0.1 y 1mM equivalentes al Trolox. De esta manera se plantearía hacer una cuantificación más acertada de la capacidad antioxidante de este extracto usando diluciones.

Esta misma característica fue determinada posterior al secado, en una dilución de 2mg del extracto seco redissuelto en 300  $\mu$ L de 10% DMSO. De igual manera que en el caso anterior, se tomó la medida de una solución únicamente de 10% DMSO con el fin de descartarla como falso positivo. En este caso se obtuvo una actividad antioxidante equivalente a  $0.82 \pm 0.01$  mM de Trolox. De manera que se presentó una disminución del 34.4% frente al resultado cuantificado antes del secado.

El resultado anteriormente descrito puede deberse a la pérdida de polifenoles, o algún otro agente antioxidante presente inicialmente en la mezcla del extracto, que no resistiera las condiciones a las que el equipo de secado lo sometió. Comprobar que sea el caso involucraría identificar los agentes antioxidantes presentes en el extracto, determinar sus condiciones de degradación y definir su volatilidad. Otra explicación que puede darse frente a la pérdida de actividad antioxidante involucra el cambio de disolvente en el que se encuentran los componentes de la mezcla, pues la manera en que ocurre la neutralización del radical libre puede verse afectada por el medio en el que sucede<sup>33</sup>. Adicionalmente, en lo reportado anteriormente por Gaviria se encontró una actividad antioxidante mucho más alta, de alrededor de 8mM equivalentes al Trolox, probablemente debido a diferencias en el tratamiento de la muestra de agrás y el extracto.

## Actividad antitumoral

Para evaluar la actividad antitumoral del extracto se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT. En éste ensayo una sal de tetrazolio (bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio) es reducida por medio de la actividad de reductasas citosólicas o deshidrogenasas mitocondriales, formando un precipitado morado correspondiente al formazán<sup>34</sup>. Para que esta reducción pueda darse la célula debe estar en un estado metabólicamente activo, denominado viable. Con el fin de comparar la cantidad de células viables presentes al final del ensayo con las que se tenían en un inicio, se plantea una medición en el tiempo cero  $T_0$  que correspondería al momento en que se realiza la adición del extracto<sup>25</sup>. Para el ensayo el extracto fue secado y luego se disuelto en una solución de medio RPMI-1640 al 10% DMSO a una concentración de 6.7 mg/mL; esto con el fin de evitar una falsa respuesta debida a la presencia de etanol, presente en el extracto original. De esta solución se realizaron diluciones sucesivas para la construcción de la curva dosis respuesta del extracto en un rango de concentraciones de  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^3$   $\mu\text{g/mL}$ .

La curva dosis respuesta se caracteriza por tener una naturaleza hiperbólica, similar a las cinéticas Michaelis-Menten<sup>35</sup>. De hecho, el modelo generado para estas curvas es similar a la ecuación logística Michaelis-Menten, sólo que el número de parámetros puede depender de la simetría en la parte inferior y superior de la curva. Estos modelos son ampliamente empleados debido a que el parámetro de inflexión en farmacología es equivalente al  $\text{IC}_{50}$ ; esta magnitud se emplea para comparar la potencia de diferentes medicamentos, entre menor sea el valor mayor es su potencia<sup>36</sup>.

Debido a la complejidad de este modelo, se hizo uso del *software* estadístico de acceso libre R, que cuenta con un paquete para la generación de estos modelos a través de un método de Newton-Raphson para la construcción de la curva dosis-respuesta de viabilidad celular en función de la concentración del extracto **Figura 6**. De esta se observa un  $\text{IC}_{50}$  de 16.8  $\mu\text{g/mL}$  con un intervalo de confianza al 95% ( $\text{CI}_{95}$ ) de 14.7-19.2  $\mu\text{g/mL}$ , la aptitud del ajuste del modelo a los datos se describe directamente con el valor *GoF* (*Goodness of Fit*, por sus siglas en inglés). Como se observa en la **Figura 8**. En un estudio previo de otras plantas del género *Vaccinium* en extractos etanólicos (100% etanol) posteriormente secados y reconstituido en 50% etanol para su posterior dilución, se reportó una

actividad antitumoral en la línea HCT-116 donde el IC<sub>50</sub> es superior a 2000 µg/mL lo cual es dos veces mayor al valor reportado en el presente trabajo de grado<sup>17</sup>.

Un estudio realizado con extracto acuoso de *Vaccinium meridionale* en cáncer colorrectal (SW480 y SW620), reportó un IC<sub>50</sub> de 59.12 y 56.10µg/mL<sup>37</sup>. La diferencia en la actividad antitumoral se puede explicar a partir del método de extracción, pues en el estudio de Maldonado-Celis et. al. se realizó una extracción por percolación en agua. De modo que existen dos variaciones principales con respecto al método usado en este trabajo: la técnica y el disolvente. Si bien no se reconoce un disolvente o mezcla optimizado específicamente para la extracción de polifenoles, menos en particular para la matriz trabajada<sup>38</sup>, debido a la estructura de los polifenoles se reconoce su afinidad a los disolventes polares como lo vienen a ser el agua y el etanol. No obstante, los polifenoles también cuentan con una estructura carbonada la cual no es afín al agua, y, dependiendo de la estructura particular de algunas de estas moléculas, podrían simplemente no ser extraídas en este medio. Lo anterior fue evidenciado en la cuantificación de polifenoles, pues aumentó la cantidad de polifenoles detectada a medida que aumentó el porcentaje de etanol presente en el medio de extracción.

Del efecto de la técnica empleada se puede discutir algo muy similar: algunos polifenoles van a ser más fácilmente extraídos con la extracción asistida por microondas y otros se extraerán más fácilmente por percolación. Un ejemplo de una comparación directa de ambos métodos para la cuantificación de polifenoles fue el estudio realizado por Kaur et. al. <sup>39</sup> en donde la cuantificación de polifenoles totales para una matriz vegetal por extracción asistida por microondas fue menor que en la extracción realizada por percolación, mientras que la cuantificación de antocianinas monoméricas resultó ser mayor en la extracción asistida por microondas. Adicionalmente también reportaron que, de los dos métodos de extracción, el que mayor efecto antioxidante presentó fue la extracción asistida por microondas. Se han realizado otros estudios con productos derivados de *V. meridionale*, como vinagres y jugos, que también demuestran inhibición del crecimiento celular <sup>40,41</sup>. De estos estudios se han propuesto dos mecanismos respecto a esta actividad: capacidades antioxidantes e inducción a apoptosis.

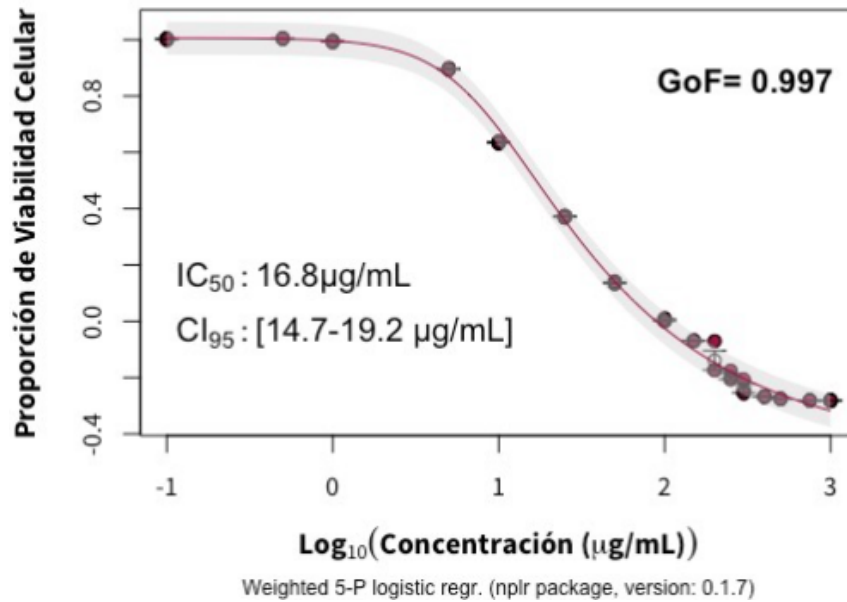


Figura 8: Curva dosis-respuesta para el extracto de agrás en células HCT-116

Con respecto al primero, se ha determinado que el estrés oxidativo es vital para el desarrollo de una carcinogénesis, lo cual se ha asociado a un fenómeno metabólico conocido como el efecto Warburg<sup>42</sup>. Este establece que las células cancerígenas prefieren la vía glucolítica aeróbica a el proceso de fosforilación oxidativa a pesar de las ventajas bioenergéticas de este último; la razón de esto en primera instancia es que varios intermediarios de rutas anabólicas requeridas para el crecimiento del cáncer son derivados de la glucolisis, por lo tanto, este recableado metabólico favorece la proliferación del tumor. Se ha determinado que esta vía metabólica genera elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), lo cual se ha asociado a un incremento en la actividad de oncogenes y receptores, estimulación de vías dependientes de los factores de crecimiento y favorecimiento a la inestabilidad genética.

Por otro lado, el segundo mecanismo está asociado a la apoptosis, que es un mecanismo celular que induce la muerte celular bajo ciertas condiciones de estrés. Estudios previos con *V. meridionale* y otras plantas del género *Vaccinium* han demostrado que estos extractos pueden activar factores importantes para el proceso apoptótico como la caspasa 3, caspasa 8, caspasa 9 y citocromo-C induciéndolo<sup>40,43,44</sup>. Para validar la actividad del extracto obtenido de *V. meridionale* una alternativa sería confirmar éste mecanismo por medio de citometría de flujo con el ensayo Anexina/PI<sup>45</sup>.

De los mecanismos anteriormente mencionados y los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, se podría plantear que el extracto de *V. meridionale* obtenido con la metodología empleada tiene potencial para el tratamiento del cáncer colorrectal. De hecho, estudios epidemiológicos hechos en poblaciones con un alto consumo de alimentos o bebidas con un alto contenido de polifenoles han demostrado que estos pueden tener un rol en la quimioprevención del cáncer colorrectal, ser sensibilizadores de quimioterapia/radioterapia además de ser posibles terapias de este cáncer<sup>46</sup>.



## Conclusiones

Se realizó la extracción de *Vaccinium meridionale* en mezclas de 30, 40 y 50% etanol, evaluando en cada extracción el porcentaje de azúcar extraído, así como la cantidad total de polifenoles, seleccionando la mejor para el análisis de su actividad antioxidante y antitumoral. Para la determinación de la cantidad de azúcares presente en los extractos se evaluaron inicialmente los métodos colorimétricos de Benedict y Barfoed, llegando a resultados no concluyentes sobre la cantidad de azúcares. Esto pues las pruebas se basan en la capacidad reductora de los azúcares para su detección y esta se ve opacada por la capacidad reductora de los polifenoles presentes en el extracto. De manera que se cuantificaron los azúcares por medio de un método basado en la refracción: el índice de Brix. De este ensayo se obtuvo que el porcentaje de azúcares estaba, en todos los casos, por debajo de sus respectivos límites de cuantificación.

Además, para elección del medio de extracción adecuado se realizó la cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto. Para esto se compararon dos métodos colorimétricos de cuantificación: Folin-Ciocalteu y Azul de Prusia, frente a su respuesta a los polifenoles y frente a su respuesta a la presencia de azúcar. Se evaluaron los parámetros de linealidad y sensibilidad, así como la detección de azúcares. De esta comparación se obtuvo como método adecuado el de Folin-Ciocalteu y a partir de éste se realizó la cuantificación de las muestras posterior. En cuanto a la cantidad total de polifenoles obtenida en cada uno de los medios de extracción, se obtuvieron  $6.50 \pm 0.02$ ,  $6.65 \pm 0.02$  y  $6.78 \pm 0.01$  mM equivalentes a pirogallol para 30, 40 y 50% de etanol respectivamente. De tal manera que se seleccionó como mezcla adecuada la última y en ella se realizaron los extractos para las pruebas biológicas siguientes. Adicionalmente, como para realizar las pruebas biológicas se requería la eliminación del etanol de la muestra y la redilución de este secado en 10% DMSO, se midió la cantidad total de polifenoles en ambas instancias, dando  $3.19 \pm 0.03$  mM equivalentes a pirogallol.

La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo TEAC para ambos estadios del extracto: antes y después del secado. Los resultados obtenidos de este análisis indican una actividad antioxidante de  $1.25 \pm 0.01$  mM equivalentes al Trolox para el extracto inicial y de  $0.82 \pm 0.01$  mM equivalentes al Trolox en el extracto redisuelto.

Finalmente, se evaluó la actividad antitumoral del extracto, después de su secado y redilución, en células de carcinoma colorrectal de la línea HCT-116 mediante el ensayo de viabilidad MTT. Esta evaluación dio como resultado un valor de  $IC_{50}$  de 16.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con un intervalo de confianza al 95% ( $CI_{95}$ ) de 14.7-19.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se destaca entonces el potencial de aplicación que tiene el extracto de agrás como agente antioxidante y antitumoral. De manera que se propone a futuro la caracterización de su perfil polifenólico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el fin de conocer la composición particular del extracto en estas condiciones. Adicionalmente, otro estudio que daría continuidad a lo expuesto sobre la actividad antitumoral en este documento es la evaluación de la presencia del apoptosoma en las células cancerígenas causada por la presencia del extracto mediante citometría de flujo.

## Referencias

- (1) Galvis Rueda, M.; Torres Torres, M. Etnobotánica y Usos de Las Plantas de La Comunidad Rural de Sogamoso, Boyacá, Colombia. *Rev. Investig. Agrar. Ambient.* **2017**, *8* (2), 187-187–206. <https://doi.org/10.22490/21456453.2045>.
- (2) Celis, M. E. M.; Franco Tobón, Y. N.; Agudelo, C.; Arango, S. S.; Rojano, B. Andean Berry (*Vaccinium Meridionale* Swartz). *Fruit Veg. Phytochem. Chemistry Hum. Health 2nd Ed Yahia EM Ed* **2017**, 869–882.
- (3) Garzón, G. A.; Narváez, C. E.; Riedl, K. M.; Schwartz, S. J. Chemical Composition, Anthocyanins, Non-Anthocyanin Phenolics and Antioxidant Activity of Wild Bilberry (*Vaccinium Meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chem.* **2010**, *122* (4), 980-980–986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.017>.
- (4) Carmona-Jiménez Y; Palma M; Guillén-Sánchez DA; García-Moreno MV. Study of the Cluster Thinning Grape as a Source of Phenolic Compounds and Evaluation of Its Antioxidant Potential. *Biomolecules* **2021**, *11* (2). <https://doi.org/10.3390/biom11020227>.
- (5) Opriş, O.; Soran, M.-L.; Lung, I.; Stegarescu, A.; Guţoiu, S.; Podea, R.; Podea, P. Optimization of Extraction Conditions of Polyphenols, Antioxidant Capacity and Sun Protection Factor from *Prunus Spinosa* Fruits. Application in Sunscreen Formulation. *J. Iran. Chem. Soc.* **2021**, 1-1–12. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02217-9>.
- (6) Varo, M. Á.; Martín-Gómez, J.; Mérida, J.; Serratosa, M. P. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum*) Grown in Southern Spain. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247* (5), 1199-1199–1208. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03701-5>.
- (7) Bastías-Montes, J. M.; Vidal-San Martín, C.; Muñoz-Fariña, O.; Petzold-Maldonado, G.; Quevedo-León, R.; Wang, H.; Yi, Y.; Céspedes-Acuña, C. L. Cryoconcentration Procedure for Aqueous Extracts of Maqui Fruits Prepared by Centrifugation and Filtration from Fruits Harvested in Different Years from the Same Localities. *J. Berry Res.* **2019**, *9* (3), 377-377–394. <https://doi.org/10.3233/JBR-180368>.
- (8) Ahmad, M.; Masood, S.; Sultana, S.; Hadda, T. B.; Bader, A.; Zafar, M. Antioxidant and Nutraceutical Value of Wild Medicinal Rubus Berries. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2015**, *28* (1), 241–247.
- (9) Baby, B.; Antony, P.; Vijayan, R. Antioxidant and Anticancer Properties of Berries. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58* (15), 2491-2491–2507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1329198>.

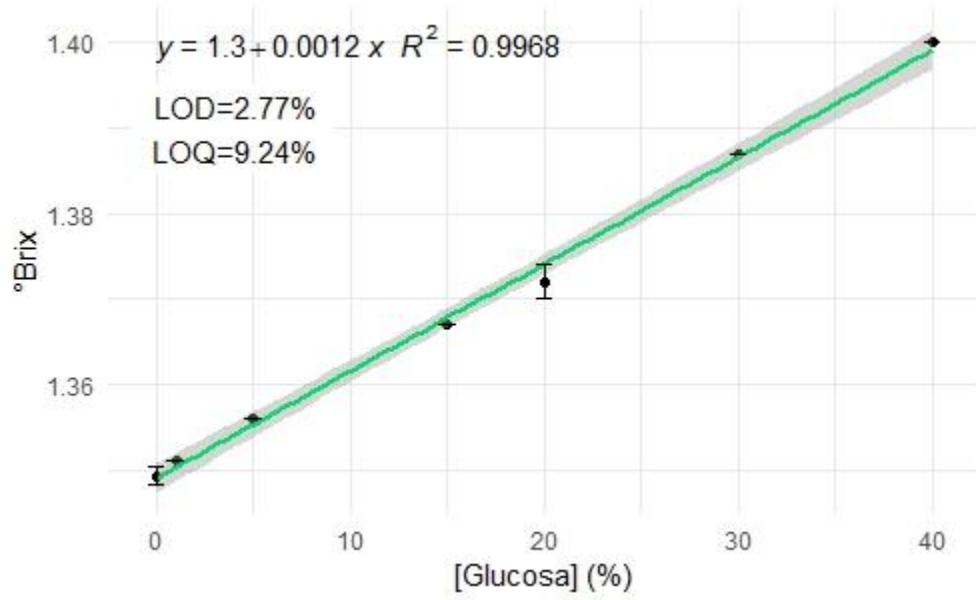
- (10) Bueno, J.; Ramos-Escudero, F.; Sáez-Plaza, P.; Muñoz, A.; José Navas, M.; Asuero, Agustín G. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *42* (2), 102-102–125. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632312>.
- (11) Amawi, H.; Ashby, C. R.; Samuel, T.; Peraman, R.; Tiwari, A. K. Polyphenolic Nutrients in Cancer Chemoprevention and Metastasis: Role of the Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) Pathway. *Nutrients* **2017**, *9* (8). <https://doi.org/10.3390/nu9080911>.
- (12) Gulzar Ahmad Nayik; Amir Gull. *Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits*; 2020.
- (13) Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chem.* **2011**, *125* (2), 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>.
- (14) Szymanska R; Pospíšil P; Kruk J. Plant-Derived Antioxidants in Disease Prevention 2018. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 2018, 2068370. <https://doi.org/10.1155/2018/2068370>.
- (15) Cherubim, D. J.; Martins, C. V.; Fariña, L.; Lucca, R. A. Polyphenols as Natural Antioxidants in Cosmetics Applications. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19* (1), 33–37. <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>.
- (16) López-Padilla, A.; Martín, D.; Villanueva Bermejo, D.; Jaime, L.; Ruiz-Rodríguez, A.; Restrepo Flórez, C. E.; Rivero Barrios, D. M.; Fornari, T. Vaccinium Meridionale Swartz Extracts and Their Addition in Beef Burgers as Antioxidant Ingredient. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98* (1), 377-377–383. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8483>.
- (17) 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. <https://doi.org/10.1021/jf025781x>.
- (18) Gaviria, M. F. Optimización de La Extracción Asistida Por Microondas En Mezclas Etanólicas de Vaccinium Meridionale y El Estudio de Su Actividad Antioxidante y Antimicrobiana., 2019.
- (19) Benedict, S. R. A Reagent for the Detection of Reducing Sugars. *J. Biol. Chem.* **1909**, *5* (5), 485–487. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91645-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91645-5).
- (20) Mohamed, E. Laboratory Activities to Introduce Carbohydrates Qualitative Analysis to College Students. *World J. Chem. Educ.* **2018**, *6* (2), 82–86. <https://doi.org/10.12691/WJCE-6-2-1>.
- (21) Ainsworth, E. A.; Gillespie, K. M. Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin-Ciocalteu Reagent. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (4), 875-875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.

- (22) Pueyo, I. U.; Calvo, M. I. Assay Conditions and Validation of a New UV Spectrophotometric Method Using Microplates for the Determination of Polyphenol Content. *Fitoterapia* **2009**, *80* (8), 465-465-467. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.06.008>.
- (23) Nenadis, N.; Wang, L.-F.; Tsimidou, M.; Zhang, H.-Y. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (15), 4669-4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>.
- (24) Melo Torres, C. P. Implementación Del Ensayo MTT (Bromuro de 3-(3,4 -Dimetiltiazol-2-Il)-2,5- Difeniltetrazolio) En Líneas Celulares TumORAles y Determinación de La Viabilidad Celular de Análogos de Ácidos Nucleico.,**2017**.
- (25) Melo Torres, C. P. Rational Approach to Evaluate Interaction Effect on Combination Therapy for Cancer Treatment with Doxorubicin and Non- Traditional Chemotherapeutic Drugs (Metformin, Losartan, Taurine and Salicylic Acid ). **2021**.
- (26) Queiroz, C.; Mendes Lopes, M. L.; Fialho, E.; Valente-Mesquita, V. L. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Rev. Int.* **2008**, *24* (4), 361-375. <https://doi.org/10.1080/87559120802089332>.
- (27) Riahi, S.; Moghaddam, A. B.; Ganjali, M. R.; Norouzi, P. Determination Of The Oxidation Potentials Of Pyrogallol And Some Of Its Derivatives: Theory And Experiment. *J. Theor. Comput. Chem.* **2007**, *06* (02), 331-340. <https://doi.org/10.1142/S0219633607003015>.
- (28) Alberty, R. A. Standard Apparent Reduction Potentials of Biochemical Half Reactions and Thermodynamic Data on the Species Involved. *Biophys. Chem.* **2004**, *111* (2), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.05.003>.
- (29) Bouchard, A.; Hofland, G. W.; Witkamp, G.-J. Properties of Sugar, Polyol, and Polysaccharide Water-Ethanol Solutions. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52* (5), 1838-1842. <https://doi.org/10.1021/je700190m>.
- (30) Cerezo, A. B.; Cătunescu, G. M.; González, M. M.; Hornedo-Ortega, R.; Pop, C. R.; Rusu, C. C.; Chirilă, F.; Rotar, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. Anthocyanins in Blueberries Grown in Hot Climate Exert Strong Antioxidant Activity and May Be Effective against Urinary Tract Bacteria. *Antioxidants* **2020**, *9* (6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060478>.
- (31) Margraf, T.; Karnopp, A. R.; Rosso, N. D.; Granato, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *J. FOOD Sci.* **2015**, *80* (11), C2397. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077>.
- (32) Cháirez-Ramírez, M. H.; de la Cruz-López, K. G.; García-Carrancá, A. Polyphenols as Antitumor Agents Targeting Key Players in Cancer-Driving Signaling Pathways. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*.

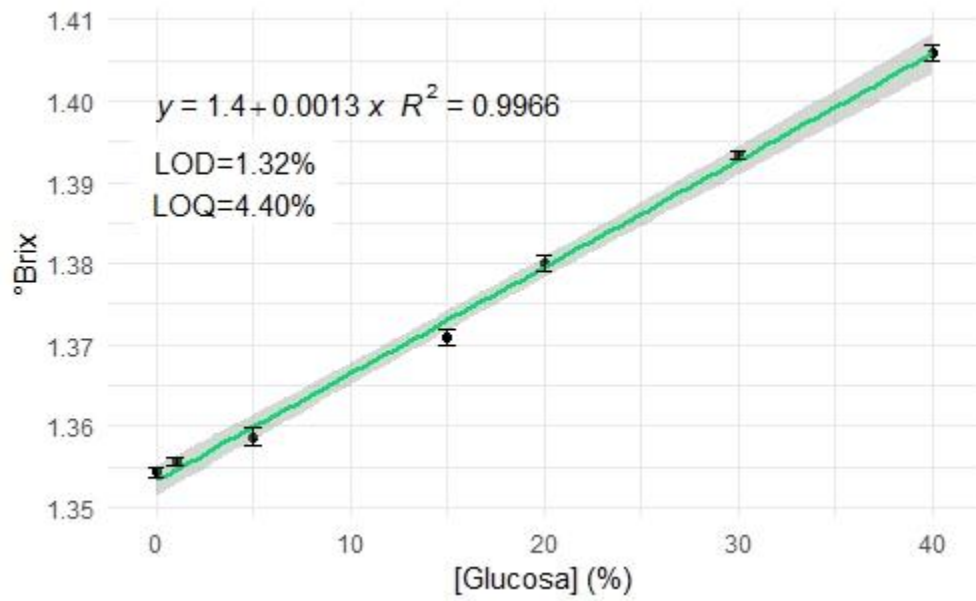
- (33) Çelik, S. E.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R. Solvent Effects on the Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants Measured by CUPRAC, ABTS/Persulphate and FRAP Methods. *Talanta* **2010**, *81* (4), 1300–1309. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.025>.
- (34) Rai, Y.; Pathak, R.; Kumari, N.; Sah, D. K.; Pandey, S.; Kalra, N.; Soni, R.; Dwarakanath, B. S.; Bhatt, A. N. Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1531–1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.
- (35) Macdougall, J. Analysis of Dose-Response Studies—Emax Model. In *Dose Finding in Drug Development*; Ting, N., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2006; pp 127–145. [https://doi.org/10.1007/0-387-33706-7\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-33706-7_9).
- (36) Gubler, H.; Schopfer, U.; Jacoby, E. Theoretical and Experimental Relationships between Percent Inhibition and IC50 Data Observed in High-Throughput Screening. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1177/1087057112455219>.
- (37) Maldonado-Celis, M. E.; Arango-Varela, S. S.; Rojano, B. A. Free Radical Scavenging Capacity and Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Vaccinium Meridionale Sw. Against Colon Cancer Cell Lines. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2014**, *19*, 172–184.
- (38) Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Ukaegbu, C. I. Extraction of Phenolic Compounds: A Review. *Curr. Res. Food Sci.* **2021**, *4*, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>.
- (39) Kaur, N.; Aggarwal, P.; Kumar, V.; Kaur, S. Influence of Different Extraction Techniques on the Extraction of Phytochemicals and Antioxidant Activities from Syzygium Cumini (Jamun) Pomace Using Taguchi Orthogonal Array Design: A Qualitative and Quantitative Approach. *Biomass Convers. Biorefinery Process. Biog. Mater. Energy Chem.* **2022**, 1–1–13. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02826-1>.
- (40) Agudelo, C. D.; Luzardo-Ocampo, I.; Hernández-Arriaga, A. M.; Rendón, J. C.; Campos-Vega, R.; Maldonado-Celis, M. E. Fermented Non-Digestible Fraction of Andean Berry (Vaccinium Meridionale Swartz) Juice Induces Apoptosis in Colon Adenocarcinoma Cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2020**, *25* (3), 272–279. <https://doi.org/10.3746/pnf.2020.25.3.272>.
- (41) Zapata Vahos, I. C.; Ochoa Agudelo, S.; Alzate Arbeláez, A. F.; Zapata Zapata, A. D.; Rojano, B. A. Vinegar of Andean Berries (Vaccinium Meridionale Sw): Antioxidant and Antiproliferative Activity In Colon Cancer Cells SW480. *Vitae* **2019**, *26*.
- (42) Shi, D.; Xie, F.; Zhai, C.; Stern, J. S.; Liu, Y.; Liu, S. The Role of Cellular Oxidative Stress in Regulating Glycolysis Energy Metabolism in Hepatoma Cells. *Mol. Cancer* **2009**, *8* (1), 32. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-32>.
- (43) Alhosin, M.; León-González, A. J.; Dandache, I.; Lelay, A.; Rashid, S. K.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Fornecker, L.-M.; Mauvieux, L.; Herbrecht, R.; Schini-Kerth, V. B. Bilberry Extract (Antho

- 50) Selectively Induces Redox-Sensitive Caspase 3-Related Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by Targeting the Bcl-2/Bad Pathway. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 8996. <https://doi.org/10.1038/srep08996>.
- (44) Somasagara, R. R.; Hegde, M.; Chiruvella, K. K.; Musini, A.; Choudhary, B.; Raghavan, S. C. Extracts of Strawberry Fruits Induce Intrinsic Pathway of Apoptosis in Breast Cancer Cells and Inhibits Tumor Progression in Mice. *PLOS ONE* **2012**, *7* (10), e47021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047021>.
- (45) Wlodkovic, D.; Skommer, J.; Darzynkiewicz, Z. Flow Cytometry-Based Apoptosis Detection. In *Apoptosis: Methods and Protocols, Second Edition*; Erhardt, P., Toth, A., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; pp 19–32. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5_2).
- (46) Mileo, A. M.; Nisticò, P.; Miccadei, S. Polyphenols: Immunomodulatory and Therapeutic Implication in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **2019**, *10*.

## Anexos

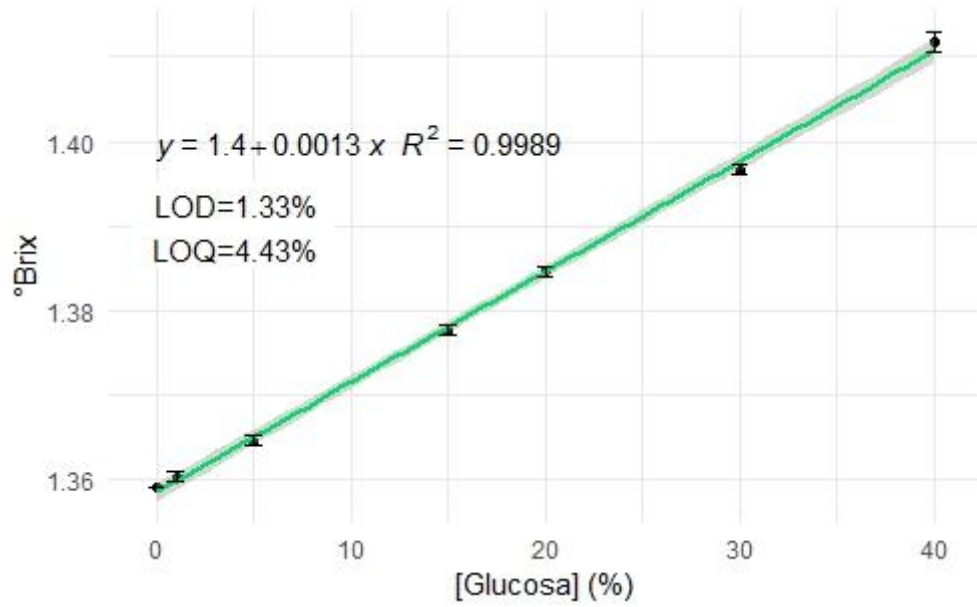


Anexo 1: Curva de calibración con 30% de etanol para el índice de Brix

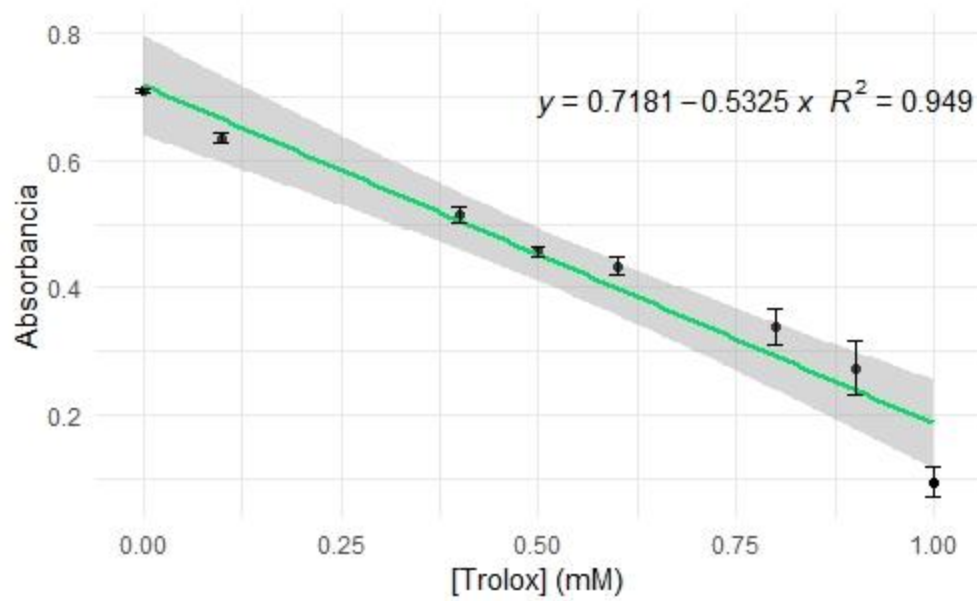


Anexo 2: Curva de calibración con 40% de etanol para el índice de Brix

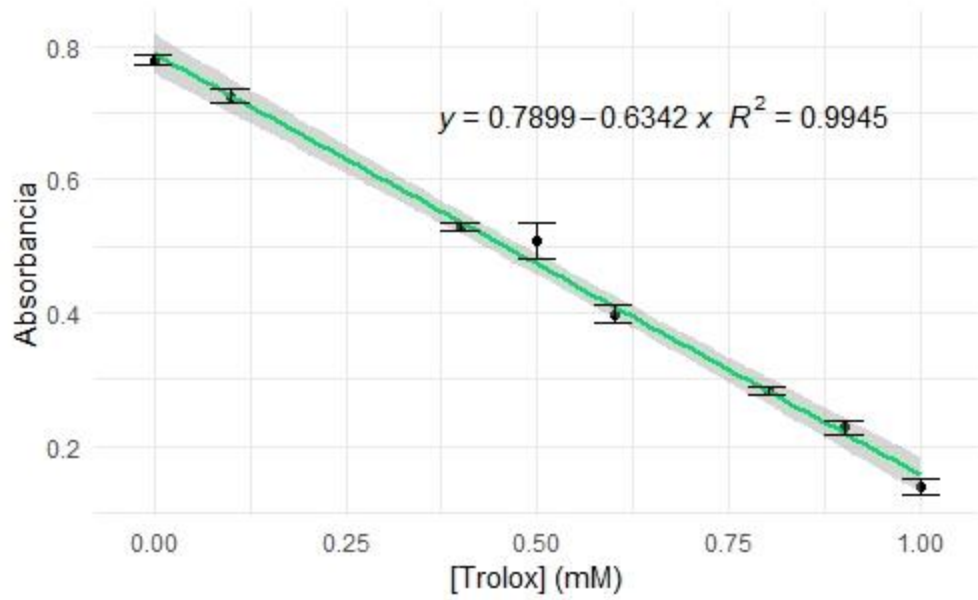




Anexo 3: Curva de calibración con 50% de etanol para el índice de Brix.



Anexo 4: Curva de calibración usada en la cuantificación de la actividad antioxidante del extracto de agrás obtenido con una solución de etanol 50%, previo al secado. Límite de detección: 0.0087mM eq. al Trolox. Límite de cuantificación: 0.029mM eq. al Trolox.



Anexo 5: Curva de calibración usada en la cuantificación de la actividad antioxidante del extracto de agrás obtenido con una solución de etanol 50%, posterior al secado. Límite de detección: 0.027mM eq. al Trolox. Límite de cuantificación: 0.089mM eq. al Trolox.