

“Perfil polifenólico y efecto quimiopreventivo, antioxidante y citotóxico del extracto hidroetanólico del fruto de *Vaccinium leucanthum* (cahuiche) en ratones CD1+ y células A7r5 y Ar42J”.

Tesis Doctoral

P R E S E N T A :

M. en C. Sánchez Franco José Antonio

Bajo la Dirección de:

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Dra. Raquel Cariño Cortés

Dra. Araceli Castañeda Ovando



Tulancingo Hidalgo, México.

2019

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Características botánicas de <i>Vaccinium</i>	3
2.2 <i>Vaccinium leucanthum</i> (cahuiche)	4
2.2.1 Usos y aprovechamiento del cahuiche	5
2.3 Compuestos con propiedades funcionales	6
2.3.1 Fibra dietética	7
2.3.1.1 Efectos fisiológicos de la fibra dietética	8
2.3.2 Antioxidantes	9
2.3.2.1 Compuestos fenólicos	11
2.3.2.2 Flavonoides	13
2.3.2.3 Antocianinas.....	14
2.4 Enfermedades crónicas no transmisibles	15
2.4.1 Cáncer	16
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 OBJETIVOS	19
4.1 General	19
4.2 Específicos	19
5 METODOLOGÍA.....	20
5.1 Desarrollo metodológico	20
Etapa 1	21
5.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos	21
5.2.1 Determinación de peso y diámetro	21
5.2.2 Determinación de color	21
5.2.3 Determinación de humedad.....	21
5.2.4 Determinación de cenizas.....	22

5.2.5	Determinación de sólidos totales	22
5.2.6	Determinación de pH	23
5.2.7	Determinación de acidez titulable	23
5.3	Análisis nutrimental.....	24
5.3.1	Valor energético.....	24
5.3.2	Determinación de proteína.....	24
5.3.4	Determinación de extracto etéreo.....	24
5.3.5	Determinación de carbohidratos asimilables	25
5.3.6	Determinación de fibra dietética total.....	25
5.3.7	Azúcares reductores.....	26
5.3.8	Determinación de micro y macro elementos.....	27
5.4	Concentración de compuestos bioactivos	27
5.4.1	Determinación de ácido ascórbico.....	27
5.4.2	Compuestos fenólicos totales.....	28
5.4.3	Flavonoides totales.....	29
5.4.4	Antocianinas totales.....	29
5.5	Cuantificación de la actividad antioxidante y la actividad quelante.....	30
5.5.1	Determinación de actividad antioxidante por ABTS●+.....	30
5.5.2	Determinación de la actividad antirradical por el método DPPH.....	31
5.5.3	Determinación antioxidante por reducción del ion férrico (FRAP)	31
5.5.4	Actividad quelante	32
Etapa 2	34
5.6	Extracción, fraccionamiento e identificación de compuestos	34
5.6.1	Extracto crudo.....	34
5.6.2	Fraccionamiento del extracto crudo en columna Sephadex LH-20.....	34
5.6.3	Identificación de compuestos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).....	35
Etapa 3	36
5.7	Población de estudio	36
5.7.1	Determinación de la toxicidad subcrónica (DL ₅₀) del extracto bioactivo de cahuiche.....	36

5.7.2 Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del extracto de <i>Vaccinium leucanthum</i>	37
5.8 Capacidad antioxidante en suero	37
5.8.1 Determinación de la capacidad antirradical DPPH	38
5.8.2 Determinación del ensayo FRAP	38
5.9 Determinaciones en tejidos: corazón e hígado	38
5.9.1 Determinación de la actividad de catalasa.....	39
5.9.2 Determinación de proteínas totales	40
5.9.3 Lipoperoxidación.....	40
Etapa 4.....	42
5.10 Actividad antioxidante enzimática.....	42
5.10.1 Catalasa.....	42
5.10.2 Superóxido dismutasa	42
5.10.3 Inhibición de peróxido de hidrógeno	43
5.11 Viabilidad celular <i>in vitro</i> por el ensayo de MTT	44
5.12 Análisis estadístico.....	45
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Etapa 1	46
6.1 Material vegetal: obtención e identificación	46
6.2 Parámetros fisicoquímicos	47
6.3 Composición nutrimental	51
6.4 Compuestos bioactivos.....	54
6.5 Actividad antioxidante y actividad quelante.....	56
Etapa 2.....	59
6.6 Extracción de compuestos	59
6.7 Fraccionamiento de compuestos.	63
6.8 Identificación de compuestos por HPLC-DAD.	65
Etapa 3.....	68
6.9 Población de estudio	68
6.10 Toxicidad subcrónica (DL₅₀) del extracto de cahuiche.....	68
6.11 Citotoxicidad y genotoxicidad del extracto de <i>Vaccinium leucanthum</i>.....	68

6.12 Análisis de capacidad antioxidante en suero	71
6.12.2 Capacidad antirradical DPPH	71
6.12.3 Capacidad antioxidante FRAP	72
6.13 Análisis en tejidos: corazón e hígado	73
6.13.1 Actividad de catalasa	75
6.13.2 Lipoperoxidación.....	76
Etapa 4	79
6.14 Actividad antioxidante enzimática.....	79
6.14.1 Catalasa.....	79
6.14.2 Superóxido dismutasa	80
6.14.3 Inhibición de peróxido de hidrógeno	81
6.15 Viabilidad celular <i>in vitro</i>.....	82
6.15.1 MTT	82
7 CONCLUSIONES.....	86
10 BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol y fruto del cahuiche.....	5
Figura 2. Estructura química de ácidos fenólicos.....	12
Figura 3. Estructura química de algunos flavonoides.....	13
Figura 4. Estructura de aglicón de antocianidina.....	14
Figura 5. Diseño metodológico.....	20
Figura 6. Diámetro del cahuiche.....	47
Figura 7. a) <i>V. leucanthum</i> (cahuiche); b) <i>V. corymbosum</i> (mora azul).	49
Figura 8. Actividad antioxidante de las especies <i>V. leucanthum</i> y <i>V. corymbosum</i> . .	58
Figura 9. Compuestos fenólicos con extracción etanólica y metanólica.....	60
Figura 10. Actividad antioxidante de las extracciones etanólicas y metanólicas.	61
Figura 11. Capacidad antioxidante de las fracciones y el extracto crudo del fruto <i>V. leucanthum</i>	64
Figura 12. Perfil de HPLC-DAD de los compuestos fenólicos del fruto <i>V. leucanthum</i>	66
Figura 13. Masa cardíaca de los ratones CD1+ con tratamiento de EVI y/o Dox.	74
Figura 14. Masa hepática de los ratones CD1+ con tratamiento de EVI y/o Dox.	75
Figura 15. Efecto de los extractos de cahuiche sobre la viabilidad de células A7r5..	83
Figura 16. Efecto de los extractos de cahuiche sobre la viabilidad de células Ar42J.	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de 100 g pf de especies <i>Vaccinium</i>	6
Tabla 2. Parámetros de color L*, a* y b* en <i>Vaccinium</i> spp.....	48
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de los frutos <i>Vaccinium</i> spp.	50
Tabla 4. Composición nutrimental de los frutos <i>Vaccinium</i> spp.....	52
Tabla 5. Micro y macro elementos en <i>Vaccinium</i> spp.....	54
Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos del <i>V. leucanthum</i>	59
Tabla 7. Extracción etanólica y metanólica de compuestos fenólicos del <i>V. leucanthum</i>	62
Tabla 8. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos del <i>V. leucanthum</i>	63
Tabla 9. Compuestos fenólicos y antocianinas del extracto crudo del fruto <i>V. leucanthum</i>	67
Tabla 10. Evaluación citotóxica y genotóxica del extracto de <i>V. leucanthum</i> en ratones CD1+.....	69
Tabla 11. Capacidad antioxidante de suero desproteínizado de ratones.	71
Tabla 12. Actividad antioxidante enzimática de los extractos de <i>V. leucanthum</i>	80

ABREVIATURAS

AA: Ácido ascórbico

Abs: Absorbancia

ABTS●+: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)

AcOEt: Acetato de etilo

AR: Azúcares reductores

AT: Antocianinas totales

AQP: Análisis químico proximal

CFT: Compuestos fenólicos totales

EOH: Etanol

DCP

I: 2,6 diclorofenolindofenol

DMSO: Dimetil Sulfóxido

Dox: Doxorubicina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EAA: Equivalentes de ácido ascórbico

EAG: Equivalentes de ácido gálico

ECNT: Enfermedades crónico no transmisibles

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ET: Equivalentes de Trolox

EVI: Extracto de *Vaccinium leucanthum*

FD: Fibra dietética

FDI: Fibra dietética insoluble

FDS: Fibra dietética soluble

FRAP: Poder de reducción antioxidante del ión férrico

FT: Fenoles totales

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

Hex: Hexano

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IDR: Ingesta Diaria Recomendada

i.g.: intragástrica

i.p.: intraperitoneal

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio

nm: nanómetros

PBS: Solución salina de fosfatos

pf: peso fresco

ppm: partes por millón

SOD: Superóxido dismutasa

TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil) triazina

Veh: Vehículo

RESUMEN

El “cahuiche” de nombre científico *Vaccinium leucanthum* es un árbol endémico de México. Se han analizado frutos del género *Vaccinium* y han identificado compuestos como fibra dietética y fenoles, sustancias empleadas como tratamiento y prevención de ciertas enfermedades. El objetivo fue valorar los parámetros fisicoquímicos y composición nutrimental del fruto *Vaccinium leucanthum* (cahuiche), extraer e identificar los compuestos fenólicos y su implementación en un ensayo quimiopreventivo *in vivo* en roedores CD1+, así como cuantificación *in vitro* de la viabilidad celular y la actividad antioxidante enzimática. Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos, composición nutrimental, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del cahuiche. Se realizó un extracto etanólico al 60% del cahuiche y fue implementando en la evaluación genotóxica y antigenotóxica *in vivo*, DPPH y FRAP en suero, así como la viabilidad celular y capacidad antioxidante enzimática. La concentración de fenoles en el cahuiche fue de $1,090 \pm 15$ mg EAG/100g peso fresco (pf), flavonoides 112 ± 3 mg EQ/100g pf y antocianinas 267 ± 7 mg de cianidin-3-glucósido/100g pf. La capacidad antioxidante por ABTS fue de $1,035 \pm 48$ μ mol ET/100g pf, para el ensayo de DPPH fue de $1,293 \pm 28$ μ mol ET/100g pf y para FRAP fue de $1,558 \pm 5$ μ mol EFe²⁺/100g pf. La toxicidad subcrónica con hasta 5,000mg/kg de extracto de cahuiche, no presentó letalidad en los ratones tratados. Se efectuó un estudio quimiopreventivo con diferentes dosificaciones de extracto de cahuiche, se observó que dosis de 300 y 600mg/kg ejercieron efectos protectores en las determinaciones de DPPH y FRAP en suero, actividad de catalasa y lipoperoxidación de hígado y corazón en comparación con el grupo control inyectados con Doxorubicina. El extracto etanólico del cahuiche no presentó citotoxicidad a concentraciones de 100 μ g/mL con respecto a la viabilidad celular por MTT en células A7r5 y Ar42J. El presente trabajo establece las bases del estudio fisicoquímico y nutrimental del cahuiche, un fruto silvestre cuyo consumo representa un potencial aporte benéfico para la salud humana como un fruto con propiedades funcionales.

Palabras clave: Cahuiche, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, ratón CD1+, viabilidad celular.

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) representan una carga social, económica y de salud significativa, por desgracia cada vez mayor en todo el mundo. Durante décadas eran principalmente un tema de los países desarrollados, hoy en día representan un problema importante de países en desarrollo. Estas tendencias reflejan la creciente urbanización, contaminación, una mala alimentación y la vida cada vez más sedentaria (Wagner and Brath, 2012).

Diversos estudios han demostrado que dietas ricas en alimentos de origen vegetal ejercen efectos protectores en contra de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y cáncer, además, proporcionan fibra dietética, vitaminas, fitosteroles, carotenoides, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Symonowicz *et al.*, 2012). Sustancias con alta actividad biológica relacionados con la protección de los componentes celulares contra el daño oxidativo, disminuyendo el riesgo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles (Wang *et al.*, 2013).

En los últimos años, los beneficios para la salud a partir del consumo de frutos rojos del género *Vaccinium*, han ganado visibilidad debido a su alta actividad antioxidante relacionado con el alto contenido de compuestos fenólicos, especialmente antocianinas, en comparación con otros frutos y vegetales (Zoratti *et al.*, 2015). Se ha informado que estos compuestos presentan diferentes actividades benéficas para salud, incluyendo antioxidantes, efectos antimutagénicos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antiproliferativos y antimicrobianos (Landete, 2012).

Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto será el analizar las propiedades de los compuestos fenólicos del fruto *Vaccinium* sp. (cahuiche), mediante pruebas *in vitro* y modelos de inducción *in vivo* para determinar los efectos de sus metabolitos bioactivos y ser recomendado su consumo a la población en general así como generar un valor agregado a la utilización del cahuiche.

2 MARCO TEÓRICO

2.1. Características botánicas de *Vaccinium*

La familia Ericaceae es quizá muy conocida en el mundo, ya que los árboles y brezos (plantas de la familia Ericaceae) que la conforman son muy llamativos. Alrededor de 13 géneros presentan frutas denominadas frutos rojos que son bayas carnosas o jugosas que se consumen localmente en donde existe su producción.

Las especies *Vaccinium* son las integrantes más importantes de la Ericaceae, ya que generan una producción significativa de frutos. Las plantas de *Vaccinium* varían en forma de epifitas a rastreras, algunas forman coronas, mientras que otras producen nuevos brotes aéreos a partir de rizomas. Su floración puede ser individual o en racimos.

La mayoría de las especies *Vaccinium* tienen su hábitat cerca de montañas, en laderas y en los trópicos, el resto se distribuye en regiones subtropicales y templadas del hemisferio norte (Hancock *et al.*, 2003; Lascurain *et al.*, 2010).

Los frutos carnosos de las especies *Vaccinium* contienen semillas pequeñas, una cutícula cerosa que cubre la epidermis de la fruta. En la familia Ericaceae, los frutos se producen en corimbos o racimos, las yemas florales se forman a finales de la temporada de verano y en otoño se producen los brotes. Los frutos nacen simples en nodos de 3 a 5 brotes verticales y racimos caídos en inflorescencias terminales.

El tamaño final de la baya está relacionado con el número de semillas por fruto y el color del mismo presenta diferentes fases en su desarrollo, que va de verde, amarillo, y rojo, hasta rojo violeta o negro.

Las especies más importantes de *Vaccinium* son *V. corymbosum* L., *V. ashei* Reade., *V. angustifolium* Ait., *V. myrtilloides* Michx., *V. macrocarpon* Ait., *V. myrtyllus* L., y *V. vitis-idea* L., con producción principalmente en Canadá, Europa, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (Hancock *et al.*, 2003).

México presenta ciertas especies de *Vaccinium*, como *V. confertum* Kunth., *V. consanguineum* Klotzch., y *V. sp.* Schlect., cuya distribución se centra en principalmente en Hidalgo, Puebla y Veracruz (Fuentes-Cervantes *et al.*, 2013).

2.2 *Vaccinium leucanthum* (cahuiche)

El *Vaccinium leucanthum* es un árbol silvestre que llega a medir hasta 6 m de altura y su tronco 20 cm de diámetro con la corteza finamente fisurada de color castaño rojizo (**Figura 1, a**). El crecimiento del árbol se genera principalmente en bosques mesófilos de montaña, laderas y endinares con clima templado-húmedo, en una altitud de 1,600 a 2,000 msnm.

La floración se lleva a cabo durante los meses de abril a mayo, mientras que la recolección del fruto se efectúa durante los meses de agosto y septiembre, aunque pueden variar según las condiciones temporales. Sus hojas son coriáceas, simples y alternas, agudas, lanceolado-oblongas a ampliamente ovadas, de 2 a 4.5 cm de largo por 1.2 a 1.6 cm de ancho, con el margen crenado-serrado.

Sus flores son blancas, nacen en racimos y tienen forma de jarrita de 2.5 a 3 mm de largo. Despliegan frutos los cuales son denominados “cahuiche” (**Figura 1, b**), los cuales son bayas redondas a globosas de 5 mm de diámetro, de color morado oscuro en la madurez, con los remanentes del cáliz y el estilo (Lascurain, *et al.*, 2010).



Figura 1. Árbol y fruto del cahuche.

2.2.1 Usos y aprovechamiento del cahuche

La producción del cahuche es desconocida ya que los especímenes crecen de forma silvestre o “traspatio”. Los frutos maduros son comestibles y su consumo es a nivel regional o en las zonas donde existe su crecimiento. Los frutos se consumen crudos, secos o en fresco y se utilizan para preparar conservas, atoles, dulces, jaleas y mermeladas, pastel, vino y para agua fresca. Su sabor agridulce es parecido al que tiene el arándano rojo (Lascurain, *et al.*, 2010; Fuentes-Cervantes, *et al.*, 2013).

En la **Tabla 1**, se muestran algunos valores correspondientes a la composición de dos especies de *Vaccinium* en 100 g de peso peso fresco (pf), los cuales pueden referir un aporte importante de fibra dietética y azúcares en su consumo.

Tabla 1. Composición de 100 g pf de especies *Vaccinium*.

Componente	<i>V. corymbosum</i> (mora azul)	<i>V. macrocarpon</i> (arándano)
Valor energético del fruto (Kcal)	62.22	26.08
Composición química (%)		
Humedad	83.20	88.00
Azúcares	11.75	4.20
Ácido cítrico	1.15	2.40
Pectina	0.66	1.20
Grasa (extracto por éter)	0.60	0.40
Proteína	0.70	0.20
Cenizas	0.30	0.25
Fibra	1.50	1.60

Fuente modificada: Hancock *et al.*, (2003).

2.3 Compuestos con propiedades funcionales

La Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos, ha definido a los alimentos y/o compuestos con propiedades funcionales como: “cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado, que pueda proporcionar un beneficio a la salud superior al de los nutrientes tradicionales que contiene” (Thomas y Eart, 1994; Pastrana *et al.*, 2017).

El sistema regulatorio japonés, FOSHU (Alimentos de uso exclusivo para la salud), describe 11 categorías de ingredientes con actividad fisiológica (Mazza, 2000; Pastrana *et al.*, 2017):

- Fibras alimentarias.
- Oligosacáridos.

- Alcoholes derivados de azúcares.
- Ácidos grasos poliinsaturados.
- Péptidos y proteínas.
- Glucósidos, isoprenoides y vitaminas.
- Alcoholes y fenoles.
- Colinas (lecitina).
- Bacterias del ácido láctico.
- Minerales.

Se espera que el consumo de los alimentos con propiedades funcionales, puedan mejorar el estado de salud de la población en su conjunto, por lo que las características sensoriales del alimento deberán ser del agrado y aceptación del consumidor.

La selección del alimento deberá garantizar las siguientes consideraciones: control de calidad, estabilidad y biodisponibilidad de los nutrimentos bajo condiciones de uso y almacenamiento. Las características sensoriales y organolépticas no deben sufrir cambios significativos, ser económicamente viables, no presentar toxicidad debido a un exceso de la dosis empleada o por interacciones con otros componentes originales del alimento. Por último, el alimento debe ser consumido regularmente y en cantidades predecibles por la población (Cortés *et al.*, 2005; Pappalardo y Lusk, 2016).

Tomando en cuenta las características antes descritas, los principales alimentos usados como vehículos con este fin, son las bebidas gaseosas, mermeladas, harinas, mayonesas, patés, margarinas, lácteos, golosinas, etc.

2.3.1 Fibra dietética

La fibra dietética (FD) es la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y la absorción en el intestino humano y que sufren una fermentación total o parcial en el intestino grueso. Las enzimas del

sistema digestivo no degradan este componente, por lo que viajan casi intacta, a través del sistema digestivo, lo que contribuye a una buena salud (IFIC, 2008; Jiang *et al.*, 2017).

Dependiendo de sus propiedades físicas y sus diferentes efectos, la FD se clasifica en soluble e insoluble. La fibra insoluble comprende a la celulosa, hemicelulosa y lignina. Este tipo de FD, aunque no se disuelve en agua, sí la absorbe, lo que le permite aumentar el volumen de las heces fecales y acelerar el tránsito intestinal. Por otro lado, la fibra soluble que incluye a las pectinas, gomas y mucílagos, al mezclarse con agua en el intestino, forma sustancias viscosas que captan grasas y azúcares simples, al mismo tiempo se caracterizan por ser rápidamente degradadas por la microbiota anaerobia del colon, dando lugar a los ácidos grasos de cadena corta (García-Peris, 2001; Ayala-Garza, 2004; Mongeau y Brooks, 2016).

Además de la FD tradicional, se deben considerar otras sustancias, que se comportan fisiológicamente como una FD, dado que no son hidrolizadas por las enzimas digestivas, pero son degradadas a nivel del colon. De esta forma la clasificación de FD se vería ampliada, fundamentalmente, con dos sustratos, los almidones resistentes y los oligosacáridos no digeribles, que incluirían los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina (García-Peris, 2001; Chen *et al.*, 2016).

2.3.1.1 Efectos fisiológicos de la fibra dietética

La FD, juega un papel importante en todas las funciones del sistema digestivo, desde la masticación hasta la evacuación de las heces. En el intestino delgado la fibra soluble por la formación de soluciones viscosas ralentiza el tiempo de tránsito. También aumenta el espesor de la capa de agua que han de traspasar los solutos para alcanzar la membrana del enterocito, lo que provoca una disminución en la absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos. La absorción de determinados minerales como el calcio, hierro, cobre y zinc pueden disminuir si se ingieren dietas muy ricas en FD (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006, Benítez-Páez *et al.*, 2016).

Los efectos fisiológicos de la FD a nivel del colon están estrechamente relacionados con su propiedad de fermentabilidad y efecto prebiótico. En este órgano tiene lugar la fermentación bacteriana. Como resultado de la fermentación colónica se producen ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico), los efectos fisiológicos más importantes de los ácidos grasos de cadena corta consisten en disminuir el pH intraluminal, estimular la reabsorción de agua y sodio, fundamentalmente en el colon ascendente, y potenciar la absorción en el colon de cationes divalentes y a nivel sistémico (metabolismo lipídico, glucémico, etc.). No más importante que éstos son los efectos que a nivel de proliferación bacteriana produce ese mismo metabolismo colónico de la FD y que le confiere a ésta efectos prebióticos (García-Peris *et al.*, 2002; Rombeau, 2004; Chen *et al.*, 2016).

2.3.2 Antioxidantes

Los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son equilibrados por la acción de antioxidantes, los cuales son moléculas que neutralizan o inhiben a los radicales libres aceptando o donando electrones para eliminar su condición impar. Los antioxidantes actúan directamente con los radicales reactivos y los inhabilita, con lo que éstos se convierten en nuevos radicales menos activos y con vida más larga que aquellos radicales que no han sido neutralizados. Estos al mismo tiempo pueden ser inhibidos por otros antioxidantes u otros mecanismos para eliminar con su estado radical (Lu, *et al.*, 2010).

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas con uno o más electrones no apareados en su órbita de valencia. Estas especies son muy inestables y muy reactivas, ya que tienden a capturar un electrón de otras moléculas generando así su oxidación (Sen, 2001; Vasalle *et al.*, 2004). Cuando se hace reaccionar con otros radicales o moléculas, un radical libre puede formar nuevos radicales. Los ROS contienen radicales libres y formas reactivas de oxígeno, al igual, pueden ser producidos por una transferencia de electrones que requiere un alto consumo de energía (Cheeseman and Slater, 1993; Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2016).

El estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, de esta forma, el exceso de producción de ROS y otros radicales se relacionan como generadores de daño tisular en condiciones patológicas severas (Govindarajan, *et al.*, 2005; Mason, 2016).

Tanto los radicales libres como los antioxidantes, se pueden categorizar como endógenos o exógenos (Rahman, 2007). Dentro de los antioxidantes endógenos se presentan: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, mismos que pueden contrarrestar ambientes oxidativos mediante la quelación de diversos peróxidos y super peróxidos. Respecto a los antioxidantes exógenos, se encuentran a las vitaminas E y C, la coenzima Q, el β -caroteno y glutatión, estos, exhiben la capacidad de reprimir la actividad de los ROS (Ziech *et al.*, 2010).

Los antioxidantes exógenos se consumen principalmente a través de la dieta por medio de frutas y verduras, lo cual indicaría que una dieta saludable o con los alimentos antes mencionados ayudaría a contrarrestar los efectos dañinos de los radicales libres (Janicki-Deverts *et al.*, 2009; Ziech *et al.*, 2010).

En la actualidad existe un interés creciente en el estudio de la composición química de las plantas y frutos, debido precisamente a las propiedades de algunos componentes que pueden estimular el sistema inmune, estabilizar concentraciones hormonales en el organismo, reducir la presión arterial así como presentar cierta actividad antibacterial y antiviral. Estos compuestos pueden inhibir, interrumpir o frenar los procesos oxidativos y contrarrestar la actividad de los radicales libres (Meyer *et al.*, 2006; Symonowicz *et al.*, 2012), un claro ejemplo de ello, son sustancias como el ácido ascórbico distribuido en los tejidos del fruto, pero en mayor concentración en la piel o cáscara (Li *et al.*, 2008; Cocetta *et al.*, 2012) y, los compuestos fenólicos contenidos tanto en plantas como sus frutos.

Existen diversos estudios en los que se ha observado una disminución en los indicadores de estrés oxidativo y una mejora en indicadores de síndrome metabólico con el consumo de antioxidantes. Kim y colaboradores (2007) observaron una mejor

función pancreática en ratas diabéticas a las que se les administró compuestos fenólicos, debido a su acción protectora hacia las células beta del páncreas en caso de hipercolesterolemia y trigliceridemia. Los compuestos fenólicos individuales o combinados, son responsables de varios beneficios a la salud, incluyendo prevención de inflamación y efectos hipocolesterolemiantes (Skrovankova *et al.*, 2015).

Klatsky (2010), refiere que el consumo de fenoles se asocia a un efecto protector, removiendo depósitos vasculares de lípidos. Se pueden citar varios estudios con el consumo de antioxidantes y la mejora de indicadores de estrés oxidativo, siendo este no único del síndrome metabólico, sino también, se ha comprobado cierta recuperación en casos de carcinoma, tanto para su tratamiento (Wang *et al.*, 2012) como su prevención (Monsuez, 2012) y enfermedades neurodegenerativas (Kovacic and Somanathan, 2012).

2.3.2.1 Compuestos fenólicos

Existen diversos tipos de polifenoles, la mayoría de ellos se encuentran en las plantas y sus frutos, y a su vez se diferencian por el tipo y contenido de polifenoles presentes en estos. Los polifenoles se dividen en grupos familiares en función de su estructura química. Hay 10 o más clases de polifenoles, siendo los mayoritarios: los ácidos fenólicos (**Figura 2**), flavonoides, estilbenos y lignanos (Tsao, 2010).

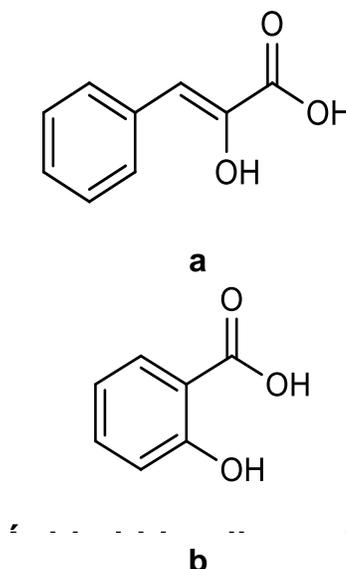


Figura 2. Estructura química de ácidos fenólicos.
a) Ácido hidroxicinámico; b) ácido hidroxibenzoico.
Fuente modificada: Myburgh, 2014.

Se han realizado diversos estudios, en donde se identificaron compuestos fenólicos con actividad antioxidante en diversos frutos, encontrando mayor concentración de estos compuestos en las hojas que en los tejidos carnosos o piel (Teleszko and Wojdylo, 2015), al igual, se han determinado los compuestos fenólicos en frutas, como: granada (Rinaldi *et al.*, 2013), arándano (Vu *et al.*, 2012), y zarzamora (de Souza *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos, en su mayoría flavonoides, son sustancias fenólicas formadas en las plantas, a partir de aminoácidos como tirosina, fenilalanina y malonato (Willcox *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2011). Estas sustancias presentan ciertas actividades biológicas, como: la inhibición del crecimiento de células cancerosas (Mudnic *et al.*, 2012); reducción del estrés oxidativo, que es un aspecto fundamental en la enfermedad de Alzheimer, entre otras enfermedades.

2.3.2.2 Flavonoides

Los flavonoides son referidos a un conjunto de compuestos caracterizados por su estructura (**Figura 3**), presentes en una amplia variedad de frutas y hortalizas. La estructura de los flavonoides deriva del núcleo de flavón (2-fenil-benzo- γ -pirona), que se caracteriza por poseer dos anillos bencénicos, unidos por tres átomos de carbono que suelen formar un heterociclo oxigenado. La quercetina y kaempferol son los flavonoles más comunes en los alimentos (Scalbert and Williamson, 2000; Murphy *et al.*, 2012).

El consumo de frutas que contienen flavonoides, producen mejoras sustanciales en varios factores de riesgo, incluyendo la presión arterial, niveles de lípidos, resistencia a la insulina, los niveles de biomarcadores inflamatorios y control de peso (He *et al.*, 2006; Skrovankova *et al.*, 2015).

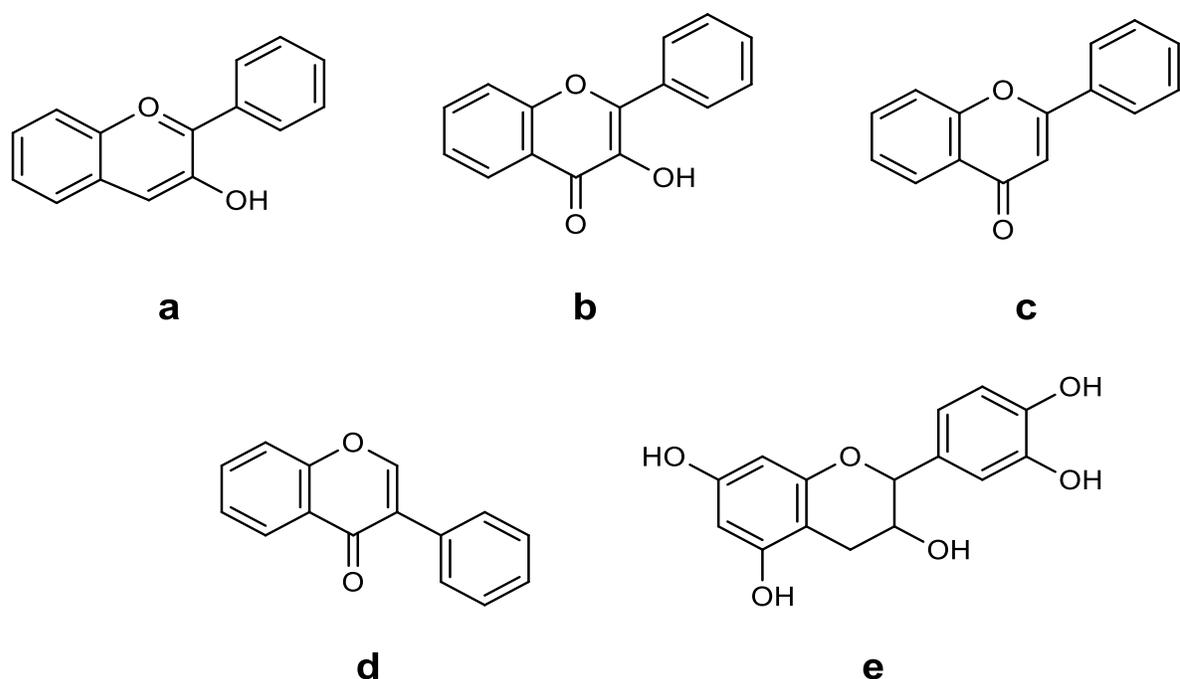


Figura 3. Estructura química de algunos flavonoides.

a) Antocianidina; b) Flavonol; c) Flavona; d) Isoflavona; e) Catequina.

Fuente modificada: Yang *et al.*, 2009.

2.3.2.3 Antocianinas

Las antocianinas (**Figura 4**), son un subgrupo de flavonoides que se encuentran comúnmente en la naturaleza. Están ampliamente distribuidos en hortalizas y frutas, tales como arándanos, moras, frambuesas, fresas, grosellas, uvas y zarzamoras. Las antocianinas son pigmentos que confieren el color a los frutos y actúan como poderosos antioxidantes; que son especialmente abundantes en bayas con pigmentos azules, rojos o violetas.

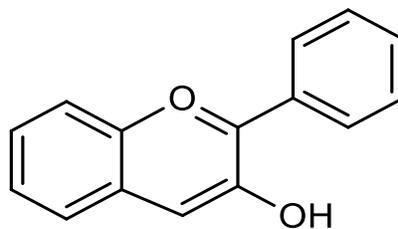


Figura 4. Estructura de aglicón de antocianidina.
Fuente modificada: Garzón, 2008.

El consumo de estas antocianinas se asocia a un menor riesgo de ciertos tipos de cáncer, salud del tracto urinario, mejora de la memoria y el envejecimiento normal. Junto con las moras o bayas frescas, se han elaborado variedades de productos, tales como jugos, vinos y colorantes alimentarios (extraídos principalmente de la piel de la uva, grosella negra y otros materiales vegetales), y estos productos contribuyen a una ingesta significativa de antocianinas (Lopes *et al.*, 2007; Nagulsamy *et al.*, 2015).

Actualmente existe el interés en el estudio de las antocianinas y sus posibles beneficios sobre la salud de los humanos debido a sus efectos antioxidantes. Los pigmentos son importantes en la industria alimentaria, ya que se utilizan como antioxidantes, potenciales sustitutos para colorantes alimentarios sintéticos y en la nutrición humana como agentes con propiedades bioactivas que protegen contra algunas patologías (Anttonen and Karjalainen, 2005; Prencipe *et al.*, 2014).

Las antocianinas de las bayas han sido ampliamente examinadas por sus efectos sobre modelos inducidos en ratones, además de su efecto antiinflamatorio, las antocianinas disminuyen la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (Meyskens and Szabo, 2005; Nagulsamy *et al.*, 2015).

La administración oral de las antocianinas de diferentes bayas puede ser un complemento seguro y prometedor para pacientes con glaucoma, mientras que extractos de bayas ricos en antocianinas tiene un efecto protector sobre la función visual durante la inflamación (Seeram, 2008).

Esta evidencia sugiere que los beneficios podrían ser derivadas de: (1) un conjunto más complejo de micronutrientes, fitoquímicos y fibra que se encuentra en frutas y verduras; (2) pueden presentar una mayor biodisponibilidad de estos nutrientes en su estado natural; (3) la sustitución de los alimentos menos saludables en la dieta (Sofi & Ródica, 2016).

2.4 Enfermedades crónicas no transmisibles

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), son aquellas que producen una serie de alteraciones fisiopatológicas amplias, complejas y profundas en las que se pueden identificar ciertas características. Entre las ECNT más reconocidas se encuentran: obesidad, diabetes, cáncer, hipertensión arterial, enfermedades cardiocerebrovasculares, enfermedades reumáticas, Alzheimer y Parkinson (Verfaillie *et al.*, 2013; OMS, 2014; Sharma *et al.*, 2014; González *et al.*, 2015), entre otras en las que figura el estrés oxidativo como parte de la etiología de su desarrollo.

Estas enfermedades comparten algunos aspectos fisiopatológicos: estrés y/o factores ambientales, más la disminución de la homeostasis que genera una serie de alteraciones fisiopatológicas que se pueden sintetizar en la tríada: estrés oxidativo, inflamación crónica y apoptosis (Pulgarón, 2013).

Muchas de las ECNT presentan comorbilidades, como por ejemplo: entre hipertensión, diabetes y obesidad (Wahlqvist, 2004; Pulgarón, 2013); diabetes tipo 2 y Alzheimer (Butterfield *et al.*, 2014), síndrome metabólico y cáncer (Ishino *et al.*, 2013; Drahos *et al.*, 2015) y además se ha propuesto que una enfermedad precede o aumenta el riesgo de presentar otra (Butterfield *et al.*, 2014).

Todas las enfermedades degenerativas se relacionan con un incremento del estrés oxidativo. El estrés oxidativo facilita la expresión de los genes encargados de la inflamación. Esta inflamación no se presenta como consecuencia de la presencia de un patógeno. Por lo tanto, los mecanismos intrínsecos que regulan la inflamación no dependen de un patógeno (bacteria, virus, hongo, células lesionadas, etc.) y en consecuencia se mantiene en la medida que se mantiene el estrés oxidativo (Lisi *et al.*, 2014).

Los principales factores de riesgo de enfermedades no transmisibles para los individuos son bien conocidos desde hace décadas y son similares en casi todos los países. El consumo de tabaco, dieta poco saludable con alimentos ricos en grasas saturadas y trans, sal y azúcar refinada (especialmente en las bebidas azucaradas), el sedentarismo, falta de descanso, el estrés económico, social y urbano, así como el consumo de bebidas alcohólicas, son causa más de dos tercios de todos los casos nuevos de enfermedades no transmisibles y puede aumentar el riesgo de complicaciones en las personas con enfermedades crónicas (Wagner and Brath, 2012; González *et al.*, 2015).

2.4.1 Cáncer

Se han realizado una gran cantidad de investigaciones que revelan el mecanismo por el cual el estrés oxidativo continuo puede provocar inflamación crónica, lo cual puede mediar la expresión de mayoría de las enfermedades crónicas, incluyendo cáncer (Reuter *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo puede activar una variedad de factores de transcripción. La activación de estos factores puede conducir a la expresión de aproximadamente 500 genes diferentes, incluyendo a aquellos para factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, quimiocinas, moléculas reguladoras del ciclo celular y moléculas antiinflamatorias. En general, las investigaciones hasta la fecha sugieren que estrés oxidativo, inflamación crónica y cáncer están estrechamente relacionados (Reuter *et al.*, 2010; Verfaillie *et al.*, 2013).

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, representan el 21.7% (8.2 millones) de las muertes por ECD (OMS, 2014). Para el año 2030, se espera que la proporción sea de 70%. Casi dos tercios de los 7.6 millones de muertes al año por cáncer en todo el mundo se producen en personas de escasos recursos y de ingresos medios, razón de una alimentación incorrecta (Boyle *et al.*, 2008; Ferlay *et al.*, 2014).

La ciencia de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas abarca tal vez sólo la mitad de un siglo. Los nuevos avances ofrecen evidencias sustanciales de los paradigmas de investigación complementarios sobre los efectos en las enfermedades y de los factores dietéticos específicos. La necesidad de dar prioridad a alimentos seleccionados y los modelos dietéticos generales en lugar de sólo los nutrientes individuales, la calidad y cantidad de hidratos de carbono y lípidos que se consumen, la importancia del equilibrio energético y el papel de los suplementos dietéticos representan varios hallazgos clave de interés (Sofi & Ródicica, 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, el consumo de ciertos alimentos, en especial los de tipo vegetal, proporcionan muchos beneficios a la salud de la población, ya sea por el contenido de compuestos fenólicos simples o combinados, flavonoides y/o antocianinas. Si bien, existen muchos estudios relacionados al consumo de diferentes berries o moras como la mora azul o el arándano, no existe uno que sea referido específicamente al fruto del cahuiche, por lo que con estudios de laboratorio y cuantificación de compuestos, se podrán realizar diversos análisis para la recomendación y consumo de este fruto del género *Vaccinium*.

3 JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han demostrado que dietas ricas en alimentos de origen vegetal ejercen efectos protectores en contra de la formación de radicales libres, enfermedades cardiovasculares y cáncer, debido al contenido de vitaminas, carotenoides, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y fibra dietética.

Se han realizado diversos estudios en frutos del género *Vaccinium*, como *V. corymbosum* y *V. macrocarpon*, en los que se han identificado diversos compuestos con actividad biológica importante, como los fenoles, resaltando entre estos a los flavonoides y antocianinas, sustancias con alta actividad antioxidante. Cabe resaltar que estas investigaciones han sido enfocadas en el tratamiento y prevención de ciertas patologías como el cáncer.

El *Vaccinium leucanthum* (cahuiche) es un fruto rojo de origen silvestre, sus frutos maduros son comestibles y se comen crudos o se utilizan para preparar atoles, jaleas y mermeladas. Su consumo es mínimo, se centra en la temporada y región en donde existe su crecimiento, lo cual limita la comercialización y su aprovechamiento.

Dadas las características físicas y químicas que presenta el cahuiche, es probable que tenga similitudes con otros frutos rojos en cuanto a la composición nutrimental y compuestos bioactivos; sin embargo, hasta el momento no hay estudios que se enfoquen en estos parámetros.

El objetivo del presente proyecto será el estudiar los efectos de los compuestos fenólicos en ensayos *in vitro* e *in vivo*, con respecto a las propiedades funcionales de los compuestos fenólicos del cahuiche.

La información que se genere será importante para dar a conocer las propiedades del cahuiche y sus beneficios para la salud, lo que impactaría en incentivar su consumo y en dar un valor agregado a la producción de este fruto rojo silvestre.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Valorar el perfil polifenólico de un extracto hidroetanólico del fruto *Vaccinium leucanthum* (cahuiche), e implementarlo en un ensayo quimiopreventivo en roedores CD1+, así como cuantificar su capacidad antioxidante y viabilidad celular *in vitro* para dar a conocer sus efectos.

4.2 Específicos

1. Identificar toxabotánicamente la especie del *Vaccinium* sp.
2. Cuantificar los parámetros fisicoquímicos y composición nutrimental del *Vaccinium* sp.
3. Analizar cuali-cuantitativamente la capacidad antioxidante del fruto y de los extractos con diferente polaridad obtenidos del *Vaccinium* sp.
4. Optimizar un extracto del *Vaccinium* sp., con diferentes concentraciones de disolvente.
5. Caracterizar el extracto con mayor capacidad antioxidante del *Vaccinium* sp. por HPLC-DAD.
6. Determinar la toxicidad subcrónica (DL₅₀) del extracto con mayor capacidad antioxidante del *Vaccinium* sp. en roedores CD1+.
7. Evaluar la capacidad quimiopreventiva del extracto con mayor capacidad antioxidante del *Vaccinium* sp. en roedores CD1+.
8. Valorar la capacidad antioxidante enzimática del extracto con mayor capacidad antioxidante del *Vaccinium* sp., así como la evaluación de la viabilidad celular.

5 METODOLOGÍA

En la **Figura 5** se presenta el diagrama metodológico que se llevará a cabo en el presente trabajo. Se realizó la comparación de los parámetros de la etapa 1 con un fruto (mora azul) del mismo género que el cahuiche.

5.1 Desarrollo metodológico

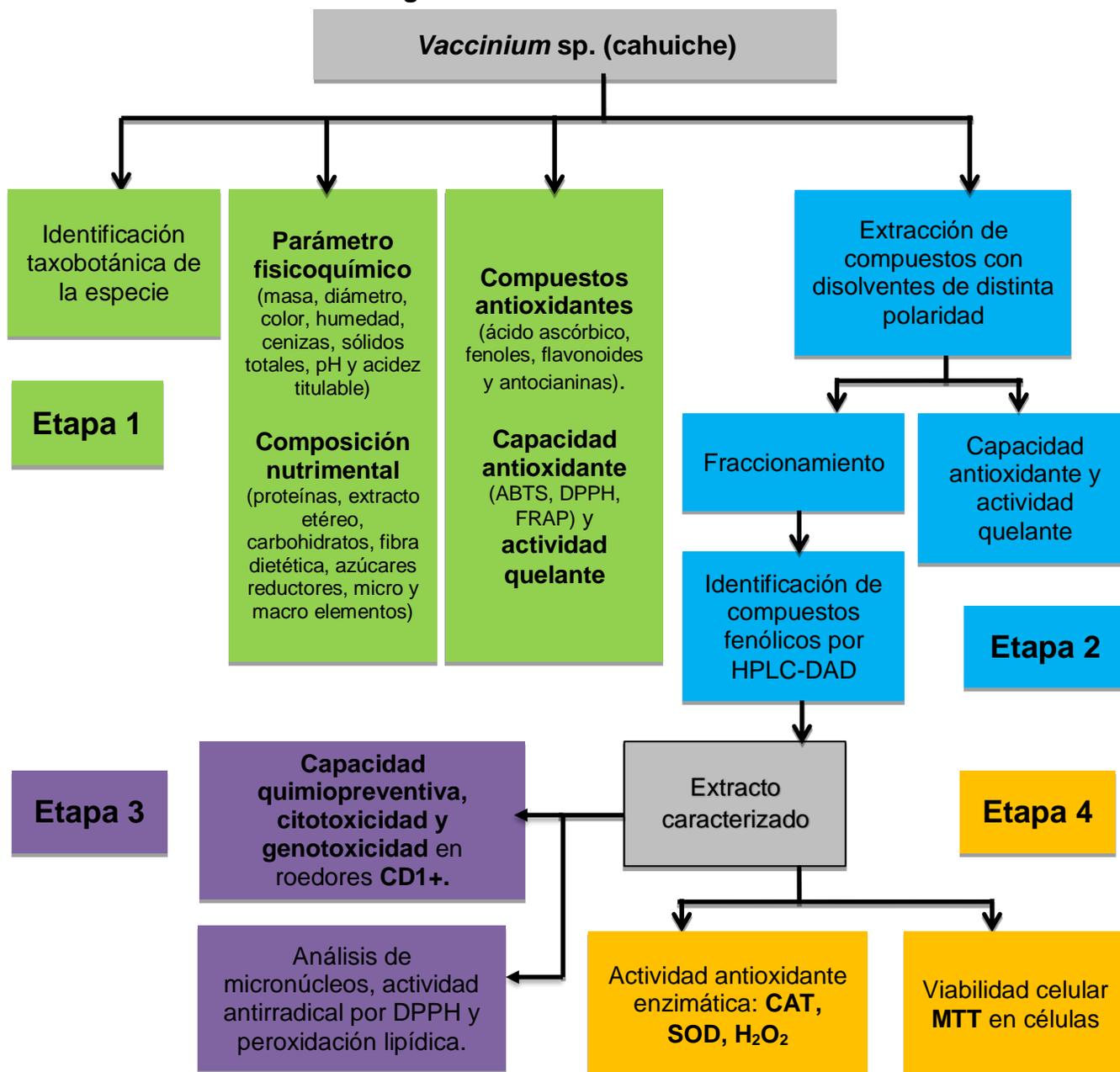


Figura 5. Diseño metodológico

A continuación se describen los métodos que se utilizarán según las etapas del diseño metodológico:

Etapas 1

5.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos

5.2.1 Determinación de peso y diámetro

El peso y el diámetro del cahuiche se determinaron mediante una balanza analítica y un Vernier (Mitutoyo) respectivamente. Se tomaron 30 frutos al azar y se realizaron las mediciones reportando los resultados como mg por fruto y milímetros por fruto.

5.2.2 Determinación de color

El color se determinó mediante un espectrofotómetro (Konica-Minolta CM-508d, Japón) en la escala L* a* b* (Maskan, 2001), los resultados se introdujeron a una calculadora de color (Color calculator Easy RGB, Logicol S.R.L. Italia) con el fin de comparar visualmente los resultados.

5.2.3 Determinación de humedad

El porcentaje de humedad se determinó mediante el método por secado al vacío (Método Oficial de la AOAC 920.151). Se tararon los crisoles en los que se pesó una alícuota de la muestra (5 g) y el cual fue introducido al horno de secado (115 °C) por 3 horas hasta que se obtuvo su peso constante. Por último, se pesó el crisol con la muestra y se realizó la diferencia, se obtuvo el porcentaje de agua contenida por medio de la fórmula descrita a continuación. Los resultados se reportaron en porcentaje de humedad.

$$\%H = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

En donde:

%H = Porcentaje de humedad

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

5.2.4 Determinación de cenizas

El método que se utilizó fue el gravimétrico por incineración de la muestra (Método Oficial de la AOAC 940.26). Se tararon los crisoles en los que se pesaron las muestras (5 g) las cuales fueron deshidratadas y posteriormente calcinadas a fuego directo con mechero en campana de extracción. Después de ser calcinadas, se introdujeron a la mufla (550 °C) por 5 horas para ser incineradas. Por último, se enfriaron en desecador durante 15 min, y se pesó el residuo hasta peso constante. Se reportó en porcentaje de cenizas, el cual se obtuvo con la fórmula que a continuación se describe:

$$\%C = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

En donde:

%C = Porcentaje de cenizas.

Pi = Peso inicial.

Pf = Peso final.

5.2.5 Determinación de sólidos totales

La determinación (°Brix) se realizó mediante un refractómetro, el cual determina el porcentaje de sólidos totales contenidos en una muestra. Se tomaron un par de gotas de la muestra con una pipeta Pasteur desechable y se vertieron en la celda del refractómetro anteriormente calibrado y enjuagado con agua desionizada y se realizó la lectura reportándose los resultados en grados Brix (°Brix).

5.2.6 Determinación de pH

El pH se determinará por medio de un potenciómetro que es un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos. La determinación se iniciará calibrando el potenciómetro, utilizando buffer 4 y 7 respectivamente, después, se verterá muestra necesaria en un vaso de precipitado hasta cubrir el bulbo del potenciómetro y se realizará la toma de valores.

5.2.7 Determinación de acidez titulable

La acidez se medirá por titulación descrita por la AOAC (método 939.05), este método se basa en determinar el porcentaje de ácido contenido en la alícuota que se titulará, determinando el punto final por medio del cambio de color que se producirá por la presencia del indicador ácido-base.

Los reactivos que se utilizaron fueron hidróxido de sodio 0.1 N y fenolftaleína al 1% en alcohol al 50% como indicador. Se llenó la bureta con NaOH 0.1 M la cual se abrió para verter un goteo constante en los matraces Erlenmeyer con agitación constante, que contuvieron la muestra diluida en agua destilada 1:9 (50 mL en total) y 5 gotas de fenolftaleína, hasta que se obtuvo un viraje a rosada persistente, se anotó el volumen de hidróxido de sodio utilizado. El resultado se reportó como porcentaje de acidez titulable.

La fórmula para obtener el porcentaje de acidez titulable fue:

$$\%AT = \frac{(V \text{ NaOH} * N \text{ NaOH} * 0.09)}{M} * 100$$

En donde:

%AT = Porcentaje de acidez titulable.

V NaOH = Volumen de hidróxido de sodio.

N NaOH = Normalidad de hidróxido de sodio.

M = Mililitros de muestra utilizada.

5.3 Análisis nutrimental

5.3.1 Valor energético

El valor energético se calculó en base al contenido teórico de proteína (4 kcal/g), extracto etéreo (9 kcal/g) y carbohidratos asimilables (4 kcal/g) de la muestra (Manzi, *et al.*, 2001).

5.3.2 Determinación de proteína

El porcentaje de proteína se realizó por el método Kjeldahl (Método Oficial de la AOAC 920.152) con el equipo automático Kjeldahl, el cual determinó la concentración de nitrógeno presente en la muestra y se utilizó un factor de conversión de 6.25 para determinar el porcentaje de proteína. El método se basó en la digestión de 1 g de muestra, la cual fue preparada con 15 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1 tableta catalizadora Kjeltabs CX y 2 mL de agua desionizada. Durante la digestión se formó sulfato de amonio que en presencia de un exceso de hidróxido de sodio al 32% liberó amoníaco, el cual fue destilado al recibir ácido bórico al 3% que formó borato de amonio el cual posteriormente fue valorado con ácido clorhídrico al 0.98 N.

5.3.4 Determinación de extracto etéreo

La determinación del extracto etéreo se llevó a cabo mediante la AOAC (Método 954.02), la cual consistió en verter 2 g de muestra dividida en el cartucho o dedal y se cubrió con algodón. Se colocó el cartucho dentro del extractor Soxhlet, en la parte inferior se ajustó un matraz y se añadió éter por el extremo superior del refrigerante (alrededor de 80 mL). Se efectuó la extracción durante 4 horas. Por último, se evaporó el éter del matraz y se secó a 100°C hasta peso constante.

El resultado se reportó como porcentaje de extracto etéreo calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{P - p}{M} * 100$$

En donde:

P = Masa en gramos del matraz con grasa.

p = Masa en gramos del matraz sin grasa.

M = Masa en gramos de la muestra.

5.3.5 Determinación de carbohidratos asimilables

La determinación de carbohidratos asimilables se llevó a cabo mediante la AOAC (Método 923.03). Se preparó una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100µg/mL). En tubos de ensaye se vertió 1 mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra. Para cada tubo se adicionó 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Se mezcló y adicionó 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado y se homogenizó.

Se atemperó la mezcla a temperatura ambiente y se determinó la intensidad del color naranja obtenido en un colorímetro a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua. La concentración de carbohidratos presentes en la muestra se calculó a partir de una curva patrón preparada en el intervalo del método (10-100µg de glucosa/mL). Los resultados se reportaron como % de carbohidratos asimilables por 100 g de muestra.

5.3.6 Determinación de fibra dietética total

La determinación de fibra dietética total (FDT) se realizó por medio del método enzimático gravimétrico utilizando el kit de FD total marca SIGMA (Total Dietary Fiber Assay Kit, SIGMA, TDF100), bajo las especificaciones del fabricante.

Se prepararon las alícuotas por cuadruplicado para someterlas a un proceso de digestión enzimática, esta consistió en la degradación de las proteínas por medio de proteasa y el almidón por medio de α -amilasa y amilogucosidasa. Posteriormente se

realizó una precipitación con 40 mL de etanol al 78%, seguido de 40 mL etanol al 95% y por último 20 mL acetona al 99.7%, en crisoles Gooch (F 40-60 micras). Al residuo se le determinó proteína y cenizas como se ha descrito anteriormente.

La fórmula que se utilizó para calcular el porcentaje de FD es la siguiente:

$$\%FDT = \frac{(R \text{ muestra} - P \text{ muestra} - A \text{ muestra} - B)}{PM} * 100$$

Donde:

%FDT = Porcentaje de fibra dietética total.

R = Promedio del peso residual (mg).

P = Promedio del peso proteínico (mg).

A = Promedio del peso de las cenizas (mg).

B = Blanco

PM = Promedio del peso de las muestras (mg).

Para la determinación de la fibra dietética soluble e insoluble, se realizaron algunas modificaciones de acuerdo a Asp y colaboradores, 1998, las cuales se describen a continuación.

La fibra dietética insoluble (FDI), fue filtrada (ídem FDT) y lavada con 40 mL de agua en ebullición, el filtrado y el lavado con agua se combinaron con la mezcla de etanol 95% a 60 °C y se dejó reposar por 60 min a razón de precipitar la fibra dietética soluble (FDS). El precipitado fue filtrado y pesado tras la eliminación de humedad en una estufa de secado a 105 °C por una noche.

5.3.7 Azúcares reductores

Los azúcares reductores (AR) se determinarán de acuerdo al método reportado por Sözgen *et al.* (2016), el cual se basa en la utilización de ácido 3-5-dinitrosalisílico (DNS) para provocar la oxidación de los AR y al mismo tiempo su propia reducción dando lugar a una reacción colorimétrica. El DNS es de color amarillo, mientras que la formación de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico se torna de color marrón cuya intensidad

será proporcional a la cantidad de AR contenidos en la alícuota. Los factores de dilución a utilizar serán 1:20.

La técnica se iniciará con la preparación de la solución de DNS. Para la curva y la muestra de estudio se verterán 30 μL de muestra y 180 μL de DNS, se incubarán en agua en ebullición durante 15 min, posteriormente se les agregará 1,230 μL de agua desionizada para atemperar la muestra y se realizará la lectura de Abs a 540 nm en el lector de microplacas. Los resultados se reportarán como equivalentes de azúcares reductores por litro (EAR/L), los cuales se calcularán a partir de una curva patrón de glucosa. A partir de la solución stock de glucosa 10 mg/mL, se obtendrán las siguientes concentraciones: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL, posteriormente se tomarán 30 μL de cada concentración y se les aplicará el método antes descrito.

5.3.8 Determinación de micro y macro elementos

Se realizará la cuantificación de los siguientes microelementos: hierro, cobre, zinc, manganeso y boro; macroelementos: sodio, potasio, fósforo calcio y magnesio. Se determinarán por digestión de HClO_4 / HNO_3 (Jones & Case, 1990) en un analizador Modelo GBC-932AA, de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

5.4 Concentración de compuestos bioactivos

5.4.1 Determinación de ácido ascórbico

Para la determinación de ácido ascórbico (AA), se empleó el método colorimétrico descrito por Dürüst *et al* (1997). El reactivo 2,6 diclorofenolindofenol (DCPI), que tiene una coloración azul-violeta y al reaccionar con el AA ocurre una decoloración a rosa tenue o incoloro. Inicialmente se realizó una dilución 1:10 de la muestra en agua desionizada y se prepararon las siguientes soluciones: DCPI, amortiguador de acetatos 1 M y solución de AA. Se realizó la curva de calibración, para esto se efectuaron concentraciones a partir de la solución de AA: 0, 10, 20, 30, 40, y 50 mg/L, se tomaron 100 μL de cada concentración para la obtención de la curva.

La técnica para la curva y la muestra de estudio se realizó vertiendo 100 μL de la muestra previamente diluida, 100 μL de amortiguador de acetatos y 800 μL de DCPI. Para la determinación de ácido ascórbico se vertieron 200 μL para leer la microplaca a 520 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó ácido oxálico como blanco al 0.4%. Los resultados se expresaron como miligramos de ácido ascórbico por 100 g de muestra (mg AA/100 g).

5.4.2 Compuestos fenólicos totales

La determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) se realizó por medio del método Folin-Ciocalteu descrito por Georgé *et al* (2005). El Folin-Ciocalteu es una mezcla de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, los cuales son reducidos a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica, esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas, por la presencia de carbonato de sodio.

Las muestras utilizadas fueron diluidas 1:10 en agua desionizada. Se realizó una curva estándar de la concentración de compuestos fenólicos (equivalentes de ácido gálico, 100 ppm), para esto se preparó una solución de ácido gálico (10 mg/100 mL de agua desionizada). A partir de esta solución se prepararon las siguientes concentraciones: 0, 100, 200 y 300 mg/L, se tomaron 200 μL de cada concentración para la obtención de la curva.

Para ello, se vertieron 100 μL de solución de Folin-Ciocalteu (1:10 en agua desionizada) más 400 μL de solución de carbonato de sodio al 7.5%. Las muestras se agitaron en Vortex y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min, para posteriormente realizar la lectura de Abs a 765 nm. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco (mg EAG/100 g).

5.4.3 Flavonoides totales

La cantidad de flavonoides se estimó según Zhishen *et al.*, (1999). Se mezcló una alícuota (0.5 mL) del extracto crudo con 4 mL de agua destilada, a la solución obtenida se le agregó 0.3 mL de nitrito de sodio al 5%, se incubó durante 5 min, se adicionó 0.3 mL de tricloruro de aluminio al 10%) y se reposó nuevamente a temperatura ambiente durante 6 min, después de lo cual se agregó 2 mL de hidróxido de sodio 1 M, se aforó con agua destilada a 10 mL.

Se leyó la absorbancia a 510 nm. Las lecturas de esta variable se interpolaron en la curva de calibración preparada con quercetina (100 ppm), caracterizada mediante la ecuación de regresión. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por 100 g de peso fresco (mg EQ/ 100 g).

5.4.4 Antocianinas totales

Para la determinación de antocianinas se empleó el método de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Los pigmentos de antocianinas sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH. La forma de flavilio predomina a pH de 1.0 y la forma incolora hemiacetal a pH de 4.5. El método de pH diferencial, se basa en esta reacción y permite la medición precisa y rápida de antocianinas monoméricas, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y otros compuestos de interferencia.

Se prepararon reactivos de cloruro de potasio a 0.025 M (pH de 1.0) y buffer de sodio a 0.4 M (pH de 4.5). Se obtuvo el sobrenadante de la muestra, de la cual, se tomaron 500 µL y se vertieron en tubos de plástico con capacidad de 15 mL con los reactivos: 4.5 mL de cloruro de potasio y 4.5 mL de acetato de sodio, respectivamente, en tubos separados. Posteriormente se agitaron en Vortex para reposarlos en baño de agua (PolyScience MX06S135-AA1B, USA) a 25 °C durante 15 min. Se tomaron 200 µL de cada tubo para su lectura. La absorbancia se midió a 510 nm y 700 nm (Lector de

microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) para ambas placas, en donde se empleó la siguiente fórmula para el cálculo de antocianinas:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = (A * MW * DF * 10,000) / (\epsilon * Tc)$$

En donde:

A = absorbancia de la resta entre valores (510 – 700) correspondiente a cloruro de potasio menos la absorbancia de la resta de valores (510 – 700) de acetato de sodio.

MW = tamaño de la molécula de cianidin-3-glucósido (449.2 g/mol).

DF= factor de dilución (1:100).

ϵ = absorción molar (26,900 L/cm/mg).

Tc= tamaño de la cubeta de la microplaca (0.52 cm).

Los resultados se reportaron como miligramos de cianidin-3-glucósido por 100 g de peso fresco (mg cianidin-3-glucósido/100 g).

5.5 Cuantificación de la actividad antioxidante y la actividad quelante.

5.5.1 Determinación de actividad antioxidante por ABTS●+

La determinación de actividad antioxidante por ABTS●+, se realizó de acuerdo al método según Re *et al.* (1999), la cual implica la producción directa del cromóforo ABTS●+ verde-azul a través de la reacción entre ABTS●+ y el persulfato de potasio. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS●+.

Se preparó una solución de ABTS●+ al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h en completa oscuridad a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, se diluyó en agua desionizada (proporción 1:15) hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 . Se realizó una curva estándar, para esto se efectuaron concentraciones a partir de la solución de etanol con Trolox: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/L, se tomaron 100 μ L de cada concentración.

La técnica para la curva y para la muestra de estudio se realizó vertiendo 100 μL de la muestra en viales más 3.9 mL de solución ABTS \bullet + previamente diluida con agua desionizada, se agitó el vial por Vortex y se reposó durante 7 min, posteriormente se leyó la Abs a 734 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó metanol como blanco. Los resultados se expresaron como micro mol equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$).

5.5.2 Determinación de la actividad antirradical por el método DPPH

Para la determinación de actividad antirradical se empleó el método DPPH (Morales & Jiménez-Pérez, 2001), el cual, es un radical libre estable que en una solución etanólica presenta una coloración violeta intenso, sí a ésta solución se le agrega una sustancia susceptible de atrapar radicales libres (Trolox), el electrón no apareado del DPPH se aparee e inmediatamente presenta una decoloración que puede ir hasta un tono amarillo.

Las muestras se diluyeron 1:10 y se realizó la solución de DPPH 6×10^{-5} mol/L en metanol. Para realizar la técnica, se vertieron 300 μL de la muestra diluida y 2.7 mL de la solución de DPPH, se agitaron en vortex y se reposaron a temperatura ambiente durante 60 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm/5 min, a 4 °C y se midió la Abs del sobrenadante a 517 nm. Se utilizó etanol como blanco. Los resultados se expresaron como micro mol equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$).

5.5.3 Determinación antioxidante por reducción del ion férrico (FRAP)

La determinación de la actividad antioxidante por FRAP, se realizó de acuerdo al método descrito por (Benzie & Strain, 1996). A un pH bajo, donde el complejo férrico-tripiridiltriazin ($\text{Fe}^3\text{-TPTZ}$) es reducido a su forma ferroso (Fe^{+2}), desarrolla un color azul intenso con absorbancia máxima a 593 nm. La reacción es inespecífica y

cualquier reacción mediana con un potencial de reducción, bajo las condiciones de reacción el Fe^3/Fe^2 -TPTZ puede reducirse a su forma a Fe^3 -TPTZ. Las condiciones favorecedoras para la reducción del complejo y el desarrollo de color, refieren que un reductante (antioxidante) está presente en la muestra estudiada.

Se realizaron diferentes soluciones como: Buffer de acetato de Na 0.3 molar a un pH de 3.6, HCl 40mM, TPTZ (31.233 mg + 10 mL de HCl 40 mM), FeCl_3 20 mM y FeSO_4 5 M. Para la preparación de FRAP, se mezclaron 100 mL del buffer de acetato, 10 mL de TPTZ y 10 mL de FeCl_3 , en relación 10:1:1. Se realizó una curva de calibración, para esto se efectuaron concentraciones a partir de la solución de FeSO_4 con agua desionizada: de 0 a 1,000 mM, se tomaron 30 μL de cada concentración para la obtención de la curva de referencia.

La técnica para la muestra de estudio se realizó al verter 30 μL en viales más 900 μL de solución FRAP y 90 μL de agua, se agitó por Vortex y se incubó a 37 °C durante 10 min, posteriormente se leyó la Abs a 593 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó agua como blanco. Los resultados se expresaron como micro mol equivalentes de Fe^2 por 100 g de peso fresco ($\mu\text{mol EFe}^2/100 \text{ g}$).

5.5.4 Actividad quelante

Para determinar la actividad quelante se utilizará el método reportado por Ak & Gülçin (2003), el cual se basa en la reacción de la capacidad quelante de la molécula de referencia EDTA sobre el ion ferroso (Fe^{2+}), posteriormente se mezclará con ferrozina, con lo que el ion ferroso que no fue secuestrado por primera vez reaccionará generando color, esta coloración será medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 562 nm. Los resultados se reportarán en porcentaje de actividad quelante.

La técnica consistirá en verter 100 μL de muestra en viales Eppendorf ambar, se le adicionará 50 μL de solución de cloruro férrico y 450 μL de metanol, se agitarán en

vortex y se reposarán durante 5 min, a temperatura ambiente, después se le agregarán 400 µL de ferrozina y se reposarán de nuevo a temperatura ambiente por 10 min, transcurrido el tiempo se realizará la lectura de Abs (562 nm). Como agente quelante de referencia se utilizará al EDTA a 0.1 M y como muestra control se empleará agua desionizada en las mismas condiciones.

La actividad quelante será calculada con la siguiente ecuación:

$$\%AQ = \frac{AC - AM}{AC} * 100$$

En donde:

%AQ = Porcentaje de actividad quelante.

AC = Absorbancia de la muestra control.

AM = Absorbancia de la muestra.

Etapa 2

5.6 Extracción, fraccionamiento e identificación de compuestos

5.6.1 Extracto crudo

Se utilizó la matriz del fruto *Vaccinium leucanthum*, que se recolectó en noviembre del 2016 en Huasca de Ocampo (Altitud 2,300 msnm, Latitud 20° 12' 10" N, Longitud 98° 35' 55" O), Hidalgo, México. Los frutos fueron liofilizados (Uniequip, Unicryo MC4L-60, Martinsried, Alemania). Una muestra de 5 g fue triturada en mortero de porcelana y macerada con etanol acuoso al 60% (relación sólido:líquido, 1:25) a temperatura ambiente durante 24 horas en oscuridad. El extracto crudo fue filtrado en papel Whatman No. 1, luego concentrado en un rotavapor a presión reducida (Büchi R-3000, Flawil, Suiza) a 35 °C y posteriormente sometido a congelación.

5.6.2 Fraccionamiento del extracto crudo en columna Sephadex LH-20

Se realizó el fraccionamiento del extracto crudo para separar, por cromatografía de exclusión de tamaño, los compuestos bioactivos presentes en la muestra. Al igual, el fraccionamiento fue realizado para corroborar si existe un efecto sinérgico o antagonista entre los compuestos del extracto crudo con respecto a la capacidad antioxidante.

Para la separación del extracto, se utilizaron 5 mL de extracto crudo equivalente a 48,000 ppm, el cual fue vertido a una columna 75 cm de alto por 2,5 cm de diámetro (BIO-RAD Econo-Column, Estados Unidos) con 50 g de Sephadex LH-20. El Sephadex fue suspendido en metanol acuoso al 50%, hidratado por 24 horas antes de ser empacado manualmente (300 mL, con flujo de 0.66 mL/min).

La columna fue preparada de modo isocrático con metanol al 35%, flujo 0.66 mL/min. Las muestras fueron colectadas cada 5 min en un colector de fracciones (BIORAD,

2110, Hércules CA, Estados Unidos) y sus absorbancias fueron medidas a 280, 320 y 520 nm (Espectrofotómetro Thermo, Génesis 6, Madison WI, Estados Unidos). Las fracciones fueron recolectadas, evaporadas bajo vacío para remover el disolvente orgánico y resuspendidas con 5 mL de metanol al 50%. La columna fue lavada con acetona al 70% (v/v) considerándose ésta como una última fracción (Rubilar *et al* 2010).

5.6.3 Identificación de compuestos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

El extracto crudo del fruto *V. leucanthum* fue analizado según lo descrito por Garzón *et al* (2010). La muestra fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.45 µm e inyectada (20 µL) en el HPLC - con arreglo de diodos (DAD, serie G1315B) (Agilent, 1100 Series, Waldbronn Alemania). El HPLC fue equipado con un desgasificador (Agilent, Serie G 1322A), una bomba cuaternaria (Agilent, serie G1311A) y un compartimiento de columna (Agilent, serie G1316A). Se empleó una columna C18 (250 mm * 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, ZORBAX Eclipse XDS-C18, Agilent).

La fase móvil consistió en 5% (v/v) de ácido fórmico en agua (solvente A), y 5% (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B), a flujo de 0.3 mL/min. Se utilizó un gradiente lineal de la siguiente manera: 0 – 20 min, 20% solvente B y 20 – 30 min, 20 – 58% solvente B. El espectro de absorbancia fue registrado cada 1.2 nm desde los 200 hasta los 700 nm. Las detecciones fueron realizadas a 320 nm para los ácidos fenólicos y 520 nm para las antocianinas. Los resultados fueron comparados con los estándares de referencia tratados con las mismas condiciones según el método de análisis. Los cromatogramas fueron obtenidos y analizados mediante el software HP Agilent, ChemStation, California, E.U. Los disolventes utilizados fueron de grado HPLC.

Etapas 3

5.7 Población de estudio

El protocolo experimental fue presentado ante el comité de ética institucional (CIEQUAL). La experimentación con animales se realizó bajo los lineamientos establecidos por el Bioterio del ICSa, UAEH, basados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se utilizaron 72 ratones macho CD1+ con peso entre 20 y 25 g procedentes del Bioterio del ICSa, UAEH.

5.7.1 Determinación de la toxicidad subcrónica (DL₅₀) del extracto bioactivo de cahuiche

Se determinó la DL₅₀ por el método de Lorke (1983), con modificaciones para establecer las dosis subcrónicas a evaluar del extracto de cahuiche. Para este procedimiento se utilizaron 7 grupos de 3 ratones por grupo, a los cuales, se administró el extracto de cahuiche por vía intragástrica (IG) en dosis de 10, 100 y 1,000 mg/kg respectivamente, durante 15 días en la primera etapa; y una segunda etapa con 3 niveles de dosificación de extracto de cahuiche durante 15 días, siendo 1,600, 2,900 y 5,000 mg/kg de peso de los ratones. Cada etapa de experimentación estuvo acompañada de un grupo control negativo (Vehículo: Veh) de 3 ratones a los cuales se administró solución salina isotónica (0.9%).

Se observó a los ratones durante los días de intervención para detectar posibles cambios de comportamiento o signos de anormalidades tales como piloerección, inactividad, anormalidades en las heces, inactividad física, pérdida de peso o mortandad, ésta última considerada como el punto final de toxicidad del EVI.

5.7.2 Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del extracto de *Vaccinium leucanthum*

a) Ensayo citotóxico y genotóxico

La administración del extracto de cahuiche se realizó por vía IG cada 24 h durante 15 días. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de 6 ratones cada uno: grupo Veh (solución salina isotónica al 0.9%), grupo control positivo tratado con Doxorubicina (Dox, 15 mg/kg) vía IP, y tres grupos administrados con diferentes dosis del extracto de cahuiche vía IG (100, 300 y 600 mg/kg de peso).

b) Ensayo anticitotóxico y antigenotóxico

Se utilizaron tres grupos más de 6 ratones cada uno, asistidos con el extracto del cahuiche (100, 300 y 600 mg/kg de peso), a los que se administró también Dox (15 mg/kg) vía IP al séptimo día de tratamiento (Šaponjac *et al.*, 2015).

Para las evaluaciones a y b, se recolectaron muestras de sangre periférica de los animales de estudio cada 48 h, partiendo del tiempo basal hasta los 15 días, realizando frotis de sangre periférica por duplicado. Al término del tratamiento se sacrificaron a los animales y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca para determinar ALT en suero desproteinizado así como la actividad antioxidante por los métodos de DPPH[•] y FRAP. Se obtuvieron hígado y corazón de cada uno de los animales para determinar la actividad de catalasa, proteínas totales y peroxidación lipídica.

Se calculó el índice de genotoxicidad determinado por la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en 1,000 eritrocitos normocrómicos (ENC) (ENCMN/1,000ENC) y el índice de citotoxicidad, que fue calculado como la relación de eritrocitos policromáticos en 1,000 ENC (EPC/ENC) (Krishna & Hayashi, 2000).

5.8 Capacidad antioxidante en suero

Previamente a la utilización del suero, éste se desproteinizó, para lo cual, se tomó 1 mL de sangre y se le añadió 1 mL de acetonitrilo al 10 M, posteriormente, se centrifugó

a 3,800 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante como suero desproteínizado para su análisis en los ensayos de DPPH y FRAP.

5.8.1 Determinación de la capacidad antirradical DPPH

La determinación se llevó a cabo por el método de Chrzczanowicz *et al* (2008). Se obtuvo el suero por centrifugación de las muestras a 3,800 rpm a 4 °C durante 10 min. Posteriormente se mezclaron 200 µL de suero con 200 µL de acetonitrilo 9.5 M y se centrifugó durante 10 min a 9,450 rpm a 4 °C durante 10 min. Por último se agregaron 25 µL del sobrenadante (suero desproteínizado), a 5 µL del DPPH 0.01 M más 970 µL de metanol. La medición se realizó después de 30 minutos de incubación en oscuridad a una absorbancia de 517 nm.

5.8.2 Determinación del ensayo FRAP

La técnica para la muestra de estudio se realizó de igual forma como fue descrita en la primera etapa de la metodología. Se vertieron 30 µL en viales más 900 µL de solución FRAP y 90 µL de agua, se agitó por Vortex y se incubó a 37 °C durante 10 min, posteriormente se leyó la Abs a 593 nm. Los resultados se expresaron como micro mol equivalentes de Fe² por gramo de tejido (µmol EFe²/g).

5.9 Determinaciones en tejidos: corazón e hígado

Al momento del sacrificio de los ratones, fueron extraídos los tejidos y pesados individualmente en una balanza analítica. Se realizó en el corazón un corte transversal al centro del tejido para separar la porción superior para el análisis histopatológico y la parte inferior para las determinaciones de catalasa, proteínas totales y lipoperoxidación.

Por su parte, del hígado fue tomado el lóbulo de mayor tamaño y fue seccionado en tres porciones, siendo la intermedia y una lateral las utilizadas para el análisis

histopatológico, el resto del hígado fue vertido en solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M con pH de 6.8 hasta su análisis de catalasa, proteínas totales y lipoperoxidación.

5.9.1 Determinación de la actividad de catalasa

Se realizó la determinación según las especificaciones de Cohen *et al* (1970).

1. Preparación de la muestra.

Se pesaron 0.5 g de hígado o de corazón de ratón y se homogenizaron con 5 mL de PBS 0.01 M pH 7.4, en un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón. El homogenizado se centrifugó a 3,000 rpm durante 6 minutos, se tomó 1 mL de sobrenadante, se vertió en un tubo de ensaye 13x100 y se reposó en hielo. Consecutivamente, se agregaron 10 μ L de etanol, se mezcló por Vortex y se reposó nuevamente en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 100 μ L de solución Tritón al 10% y se mezclan con Vortex. Posteriormente se tomaron 100 μ L de la muestra y se agregaron 4.9 mL de PBS (diluido 9:100 con agua desionizada).

2. Determinación de la actividad de catalasa.

Toda la reacción se llevó a cabo en baño de hielo con intervalos de 10 segundos entre cada muestra para agregar los reactantes.

Se vertieron 0.5 mL de homogenizado (hígado o ratón) en tubos de 20 mL, a la par, se procesó una muestra "blanco" la cual contuvo 0.5 mL de agua destilada. Se agregaron 5 mL de H₂O₂ 6 mM (en solución de fosfatos 0.01 M pH 7.0) y se mezcló con Vortex, exactamente pasados 3 minutos se detuvo la reacción con la adición de 1 mL de H₂SO₄ (16 mL de H₂SO₄ en 100 mL de agua destilada) se mezcló nuevamente con Vortex y se leyó a una absorbancia de 480 nm.

Posteriormente a las muestras se les agregó 7 mL de solución KMnO₄ 0.01 N (316 mg/L) se mezclaron en Vortex y se leyó inmediatamente a una absorbancia de 480 nm. Los resultados se expresaron como Kx10²/min.

5.9.2 Determinación de proteínas totales

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras homogenizadas mediante el método de Lowry (1951). El principio del método se basa en la reactividad del péptido nitrógeno con cobre bajo condiciones alcalinas y la subsiguiente reducción del Folin-Ciocalteu y el ácido fosfomolibdico fosfotúngstico. Se requirieron las siguientes soluciones: Solución A: Na_2CO_3 al 2% y tartrato de sodio al 0.02% en NaOH 0.1 N. Solución B: CuSO_4 al 0.5% en agua destilada. Solución C: 50 mL de la solución A + 1 mL de la solución B. Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 1:1 con agua destilada.

Se pesaron 0.5 g de tejido y se homogenizo (homogenizador de vidrio con pistilo de teflón) en 5 mL de agua desionizada. Se tomaron 100 μL y se agregaron 900 μL de agua tridestilada. De la dilución anterior se tomaron 20 μL y se le agregaron 80 μL de agua tridestilada. Se utilizó un control el cual fue 100 μL de agua tridestilada. A las muestras problema y al control, se agregaron 2.4 mL de reactivo Bradford (ácido fosfórico al 85%, alcohol etílico, azul de Coomasie G-250). La absorbancia fue leída a 595 nm.

Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1 mg/mL): 0.5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50, 60, 80 y 100 μL , los tubos fueron aforados con agua a 100 μL .

5.9.3 Lipoperoxidación

La determinación se realizó según Beuge & Austin (1978). Se pesaron 0.5 g de tejido y se homogenizo (homogenizador de vidrio con pistilo de teflón) en 5 mL de agua desionizada. Se tomaron 300 μL del homogenizado y se agregaron 700 μL de Tris-HCl (150 mM, pH 7.4), se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15% y se puso en ebullición durante 45 minutos. Se

centrifugó la muestra a 3,000 rpm durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 532 nm.

Cálculos:

$$C = \frac{A}{El}$$

Donde:

A: absorbancia de la muestra

E: coeficiente de extinción del Malondialdehído (MDA)= $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

L: longitud de la celda (1 cm)

Etapa 4.

5.10 Actividad antioxidante enzimática

5.10.1 Catalasa

La actividad de catalasa fue determinada en el extracto de cahuiche por el método colorimétrico de Goth (1991). Se utilizaron 60 μL del extracto (diluido con 20% de DMSO y solución salina de fosfatos (PBS), pH 7.4), se incubó con 60 μL de sustrato H_2O_2 (65 mM en PBS, pH 7.4). El sustrato y la reacción enzimática fueron detenidas con la adición de 100 μL de molibdato de amonio (32.4 mM en PBS, pH 7.4). La actividad de catalasa fue medida con el uso de un fluorímetro (FluoStar Optima, BMG LAbTech, Alemania) a una longitud de onda de 410 nm.

La actividad de catalasa (U/mg proteína) fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de catalasa} \left(\frac{U}{\text{mg proteína}} \right) = \frac{(AbsBlancoA - AbsMuestra)}{(AbsBlancoB - AbsBlancoC)} \times 271$$

En donde:

Blanco A: incluye 60 μL del extracto, 60 μL del sustrato de H_2O_2 y 100 μL de molibdato de amonio.

Blanco B: incluye 60 μL de PBS, 60 μL de sustrato H_2O_2 y 100 μL de molibdato de amonio.

Blanco C: incluye 120 μL de PBS y 100 μL de molibdato de amonio.

5.10.2 Superóxido dismutasa

La actividad de inhibición de Superóxido dismutasa en el cahuiche fue determinada utilizando el método descrito por Marklund y Marklund (1974) con modificaciones menores. Se utilizaron 8 μL de los diferentes extractos (diluidos con 20% de DMSO y agua Milli-Q) en concentraciones de 0.125 a 2 mg/mL. El extracto fue mezclado con 8 μL de solución de Pyrogallol (40 mM, diluido con agua Milli-Q) y 120 μL de amortiguador Tris-HCl (50 mM a pH 8.5) conteniendo EDTA (10 mM).

Después de 10 minutos de reacción, se añadieron 40 μL de HCl 1N para detener la reacción. Se utilizó 8 μL de ácido ascórbico (concentraciones de 0.125 a 2 mg/mL) como control positivo y 8 μL de agua Milli-Q como control negativo. La absorbancia fue medida a 410 nm. La actividad de Superóxido dismutasa fue calculada mediante la siguiente ecuación y fue expresada como IC_{50} en base al porcentaje de inhibición entre 20 y 80% de los diferentes extractos.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left(\left(\frac{(A - B)}{C} \right) \times 100 \right)$$

En donde:

A: absorbancia de la muestra/ácido ascórbico con el reactivo.

B: absorbancia de la muestra/ácido ascórbico sin el reactivo.

C: absorbancia del control negativo.

5.10.3 Inhibición de peróxido de hidrógeno

La actividad de inhibición de peróxido de hidrógeno fue determinada en los extractos de cahuiche, utilizando el método descrito por Runch (1989). Una solución de H_2O_2 (20 mM) fue preparada en PBS (pH 7.4). A las diferentes concentraciones de los extractos (0.125 a 2 mg/mL) diluidas en etanol se les agregó H_2O_2 y se incubó durante 10 minutos. Se utilizó un blanco conteniendo PBS sin la adición de H_2O_2 , al igual, se utilizó ácido ascórbico (concentraciones de 0.125 a 2 mg/mL) como control positivo. La concentración de H_2O_2 fue determinada espectrofotométricamente a una absorbancia de 230 nm mediante la siguiente ecuación y fue expresada como IC_{50} en base al porcentaje de inhibición entre 20 y 80% de los diferentes extractos.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{1 - A1}{A0} \right) \times 100$$

En donde:

A1: absorbancia de la muestra.

A0: absorbancia del Blanco (extracto diluido con PBS sin H₂O₂).

5.11 Viabilidad celular *in vitro* por el ensayo de MTT

Para la viabilidad celular *in vitro* por el ensayo de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), se utilizaron dos cepas de roedores, A7r5 (aorta de embrión de rata) y Ar42J (carcinoma pancreático de rata). El ensayo de MTT fue utilizado para investigar el porcentaje metabólicamente activo de células posterior a su incubación con diferentes extractos o muestras en estudio.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1x10⁴ células por pocillo y fueron incubadas (37°C y saturación de CO₂ de 5%) durante 24 horas (Incubadora Binder, CB 150, Alemania). Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de cahuiche (10, 50 y 100 µg/mL) y fueron incubados nuevamente durante 24 horas.

Después de transcurrir el tiempo, 10 µL de solución MTT (5 mg/mL diluido con solución de Hank's) fue agregada a las células (por pocillo) y se incubó durante 2 horas. Posterior de haber transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y los cristales formados por las células fueron disueltos con 100 µL de DMSO.

La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 570 nm en un fluorímetro. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado como la relación de la media de las absorbancias (tres pocillos por cada concentración de los extractos) de las células no tratadas contra las células tratadas (Trevisi *et al.*, 2006).

El porcentaje de viabilidad celular fue calculada utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{570} \text{ células con tratamiento}}{\text{Abs}_{570} \text{ células sin tratamiento}} \times 100$$

5.12 Análisis estadístico

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y se realizó un diseño experimental cuantitativo completamente al azar.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre grupos de tratamiento se determinó con la prueba Tukey-Kramer, mediante el software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA.).

Los valores en $P \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados y la discusión en base a las etapas del diseño metodológico.

Etapa 1

6.1 Material vegetal: obtención e identificación

Debido a la naturaleza de la floración y cosecha del fruto cahuiche, que se generan durante los meses de abril–mayo y septiembre–octubre, respectivamente, se realizó el análisis y evaluación de un fruto del mismo género, pero diferente especie (*Vaccinium corymbosum*: mora azul), con el fin de poner a punto las diferentes técnicas analíticas y obtener una referencia a los resultados obtenidos y así validar la metodología. A continuación se presentan los siguientes resultados.

Los frutos de la especie *Vaccinium leucanthum* silvestre (cahuiche), fueron recolectados del Municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo (Altitud 2,300 msnm, Latitud 20° 12' 10" N, Longitud 98° 35' 55" O), México. La recolección se llevó a cabo a las 7:00 h con temperatura mínima de 7 °C y temperatura máxima de 18 °C, durante la temporada de otoño en noviembre de 2016. Se seleccionaron los frutos en su estado de madurez fisiológica (determinado por el color del fruto), sin daños físicos. Se utilizó el fruto completo y la muestra fue almacenada a -75 °C en un ultracongelador (Thermo scientific, Forma 703, EEUU) hasta su análisis.

Los frutos de la especie *Vaccinium corymbosum* (mora azul) se obtuvieron en un centro comercial de la marca Global Premier (Global Premier Frozen Berries S.A. de C.V., Estado de México, México). Se utilizó el fruto completo y la muestra fue ultracongelada a -75°C hasta su análisis.

La identificación de la especie de *Vaccinium* se llevó a cabo en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, registrando en nombre de *Vaccinium leucanthum* Schltld., ejemplar de herbario A. D. Hernández Fuentes 15, depositado en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH (HGOM).

6.2 Parámetros fisicoquímicos

El peso registrado del cahuiche fue de 180.0 ± 12.68 mg y su diámetro fue de 6.75 ± 0.42 mm, con el fin de tener una imagen más clara de las dimensiones del fruto, se presenta la **Figura 6**, en donde se comprara con un objeto de uso común siendo el caso de una moneda de 1 peso (moneda nacional mexicana) en el que el cahuiche representa un tamaño pequeño.



Figura 6. Diámetro del cahuiche.

Los parámetros de color L^* , a^* y b^* se muestran en la **Tabla 2**. Con el fin de llevar a cabo una comparación visual de los resultados, se incluyeron rectángulos de color que representan la tonalidad de los frutos obtenidos mediante una calculadora de color en la escala CIE-Lab. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en todos los parámetros de color para ambos frutos. L^* mostró valores significativamente mayores para Cahuiche.

Tabla 2. Parámetros de color L*, a* y b* en *Vaccinium* spp.

Determinación	<i>V. leucanthum</i> (cahuiche)	<i>V. corymbosum</i> (mora azul)
Parámetros de color		
L*	46.56±0.99 ^b	20.92±0.78 ^a
a*	21.26±1.02 ^b	8.58±0.48 ^a
b*	2.62±0.60 ^b	-23.33±1.61 ^a

Letras diferentes en cada fila representan valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

El parámetro L indica la luminosidad o brillo, por lo que el color del cahuiche resultó ser más luminoso que la mora azul. El parámetro a* mostró resultados positivos en ambos frutos, siendo mayor el valor encontrado en cahuiche. Los valores positivos del parámetro a* indican una tonalidad roja y valores negativos indican una coloración verde. Esto coincide con el aspecto visual de los frutos, siendo el cahuiche el que presenta una tonalidad rojiza oscura (**Figura 7: a**).

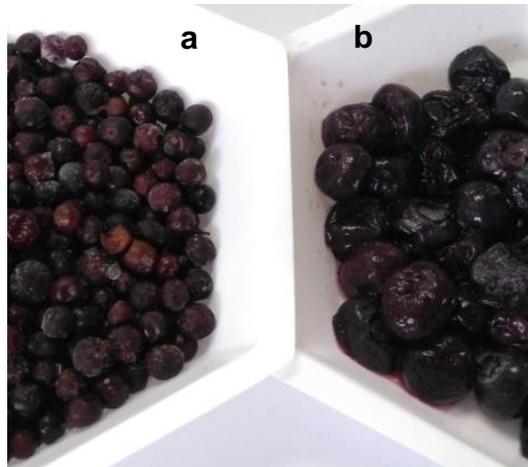


Figura 7. a) *V. leucanthum* (cahuiche); b) *V. corymbosum* (mora azul).

Con respecto al parámetro b^* se encontró un valor positivo para cahuiche y un valor negativo para mora azul. Los valores positivos de este parámetro indican una tonalidad amarilla, mientras que los valores negativos representan una tonalidad azul. Este resultado era el esperado de acuerdo al aspecto visual que presentan los frutos, ya que la mora azul tiene una tonalidad que tiende más hacia el color azul que hacia el amarillo (**Figura 7: b**).

El color de los frutos depende de la composición y concentración de compuestos fenólicos, entre los que se encuentran las antocianinas, las cuales absorben a diferentes longitudes de onda, produciendo una gama de colores que va desde el amarillo naranja hasta el rojo y el azul (Li et al., 2011; Zielinska y Michalska, 2016).

Continuando con los parámetros fisicoquímicos, los resultados se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de los frutos *Vaccinium* spp.

Determinación	<i>V. leucanthum</i> (cahuiche)	<i>V. corymbosum</i> (mora azul)
Humedad (g H ₂ O/100 g pf)	73.35±0.37 ^a	86.48±0.14 ^b
Cenizas (g/100 g pf)	0.61±0.01 ^b	0.27±0.02 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	14.67±0.38 ^b	13.77±0.23 ^a
pH	3.08±0.10 ^a	3.94±0.02 ^b
Acidez titulable (%)	1.06±0.02 ^b	0.97±0.01 ^a

Letras diferentes en cada fila representan valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

El fruto que presentó una humedad significativamente mayor ($P \leq 0.05$) fue la mora azul. El cahuiche es un fruto silvestre, cuyas características dependen en gran medida de las condiciones climáticas en las que se desarrolla, por lo que el menor contenido de humedad podría deberse a diversos factores entre ellos una disminución de la precipitación pluvial, condiciones del suelo, temperatura y altitud sobre el nivel del mar donde se desarrolla, además de ser un fruto diferente a la mora azul, con características de crecimiento y desarrollo propias de su especie (Zorenc et al., 2016).

Con respecto al contenido de cenizas y sólidos solubles totales, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre los frutos, siendo mayores los valores presentados por cahuiche para ambos parámetros. Estos resultados están relacionados con el contenido de humedad discutido anteriormente.

En base a los resultados obtenidos para pH y acidez titulable, se puede observar que ambos frutos presentan características ácidas. Sin embargo, se encontraron valores significativamente menores ($P \leq 0.05$) de pH en cahuiche. Este valor coincidió con un mayor porcentaje de acidez titulable en dicho fruto con respecto a la mora azul. Lo cual indica una relación entre el contenido de acidez titulable y el pH.

6.3 Composición nutrimental

Los valores de la composición nutrimental de las especies de *Vaccinium* se presentan en la **Tabla 4**, en donde el fruto que obtuvo un valor energético estadísticamente mayor ($P \leq 0.05$) fue el cahuiche, a diferencia de 56 a 62.2 kcal por cada 100 g peso fresco (pf) reportado en otros *Vaccinium* spp. (Lizaur *et al.*, 2008). El contenido energético de cahuiche tiene relación con el alto contenido de carbohidratos ya que 71 de 78.77 kcal corresponden a esta determinación.

Los parámetros de carbohidratos y fibra encontrados en cahuiche resultaron ser significativamente mayores ($P \leq 0.05$) que los encontrados en mora azul en este trabajo y mayores a los publicados por diversos investigadores en el análisis de la mora azul, los cuales han reportado valores de 12.7 a 14.8 g/100 g pf para carbohidratos asimilables y valores de 1.48 a 1.5 g/100 g pf para fibra (Hancock *et al.*, 2003; Chang-Ho *et al.*, 2008).

El contenido de fibra puede definir al cahuiche como un fruto con propiedades funcionales ya que el porcentaje que contiene sobrepasa lo reportado en frutos de la misma especie e inclusive si se compara con otros frutos como fresa, grosella negra, y aronia (Kosmala *et al.*, 2014).

A pesar de que el cahuiche también presenta valores estadísticamente mayores en el porcentaje de extracto etéreo y de proteína cruda que la mora azul, el aporte de estos componentes al contenido energético total del fruto no es significativo.

Tabla 4. Composición nutrimental de los frutos *Vaccinium* spp.

Determinación	<i>V. leucanthum</i> (cahuiche)	<i>V. corymbosum</i> (mora azul)
Valor energético (kcal/100g pf)	78.77±0.73 ^b	52.30±0.16 ^a
Proteína (g/100g pf)	1.07±0.01 ^b	0.74±0.01 ^a
Extracto etéreo (g/100g pf)	0.40±0.00 ^a	0.45±0.00 ^b
Carbohidratos (g/100g pf)	24.57±0.14 ^b	12.07±0.02 ^a
Fibra dietética total (g/100g pf)	8.35±0.21 ^b	2.41±0.08 ^a
Fibra dietética soluble (g/100g pf)	1.25±0.03 ^b	0.38±0.05 ^a
Fibra dietética insoluble (g/100g pf)	7.10±0.17 ^b	2.03±0.01 ^a

pf: peso fresco. Letras diferentes en cada fila representan valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

El contenido de azúcares reductores (AR) en el cahuiche fue de 226.06±3.03 mg equivalentes de glucosa por cada 100 g (mg EG/100 g), mientras que la mora azul presentó valores de 128.89±9.26 mg EG/100 g. Estos resultados pueden deberse al alto contenido de carbohidratos en ambas muestras y se comparan con los resultados en diversos frutos, en los que se han reportado valores de 70 a 125 mg EG/100 g para uva (*Vitis vinifera*) 'Cabernet Sauvignon', 417 mg EG/100 g para frambuesa (*Rubus ideaus* L.) y 1,566 mg EG/100 g para madroño (*Arbutus unedo* L.) (Alonso *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015).

Los minerales son nutrimentos reconocidos como elementos esenciales o constituyentes esencialmente potenciales para la salud humana, ya que juegan un papel importante en el desarrollo de membranas, huesos, dientes y músculos.

El contenido de macro elementos y trazas minerales, están relacionados con varios procesos fisiológicos y bioquímicos en los humanos, ya que una deficiencia o toxicidad pueden afectar el balance hídrico y electrolítico, así como la catálisis metabólica, el enlace de oxígeno y la función de las hormonas (Faria *et al.*, 2005; Fernández-Panchón *et al.*, 2008; Nile y Park, 2014).

Las principales fuentes de micro y macro elementos son las verduras, legumbres y algunos frutos. La concentración de dichos compuestos puede variar dependiendo de la materia prima (Chun y col., 2005; Murphy y col., 2012).

La cuantificación de micro y macro elementos contenidos en el cahuiche y en la mora azul se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Micro y macro elementos en *Vaccinium* spp.

Determinación	<i>V. leucanthum</i> (cahuiche)	* <i>V. corymbosum</i> (mora azul)
Micro elementos (mg/kg)		
Hierro	114.20±0.95	1.5 a 6
Cobre	11.30±0.26	0.3 a 0.6
Zinc	37.01±0.10	0.6 a 1.2
Manganeso	37.10±0.20	12 a 39
Boro	71.81±0.62	NR
Macro elementos (g/100 g)		
Sodio	0.77±0.02	0.11 a 0.22
Fósforo	0.32±0.04	1.0 a 1.5
Potasio	0.81±0.02	5.6 a 8.0
Calcio	0.94±0.03	1.5 a 3.5
Magnesio	0.29±0.02	0.6 a 1.0

NR: No Reportado

*Fuente: Faria y col., 2005; Yi y col., 2005; Fernandez-Panchon y col., 2008.

6.4 Compuestos bioactivos

La concentración de ácido ascórbico fue 102.3 ± 3.4 mg AA/100 g en cahuiche y 93.1 ± 7.1 mg AA/100 g para la mora azul, estos resultados muestran diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). La ingesta diaria recomendada (IDR) de vitamina C varía entre 25 y 75 mg AA para niños y adultos y 130 ± 5 mg AA en caso de embarazadas y lactantes (Monser, 2000; Casanueva y col., 2008). Considerando que 100 g de cahuiche o mora azul aportarían el 100% de los requerimientos diarios

de vitamina C para una persona, se referiría a estos frutos con un alto aporte de ácido ascórbico.

Con respecto a la concentración de compuestos fenólicos, el cahuiche presentó mayor contenido en comparación con la mora azul, encontrando $1,090.3 \pm 15.2$ mg EAG/100 g y 907.0 ± 12.0 mg EAG/100 g respectivamente, los valores presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Según diferentes autores (Chun y col., 2005; Williamson y Holst, 2008), establecen que siguiendo la recomendación de consumir 5 frutas y vegetales diariamente, se aportaría una cantidad de polifenoles mayor de 0.5 g. De esta forma, 100 g de cahuiche o mora azul contribuirían con un aporte importante a la recomendación por estos investigadores.

Para la concentración de flavonoides totales, los valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) ya que los datos encontrados fueron 112.0 ± 3.6 mg EQ/100 g para Cahuiche y 109.0 ± 2.7 mg EQ/100 g para mora azul. A pesar de que se necesitan más estudios para establecer una IDR para los flavonoides y para cada subclase de flavonoides, actualmente la IDR de flavonoides totales podría estar entre 250-400 mg/día (Peluso y Palmery., 2015), por lo que el consumo tanto de cahuiche o de mora azul contribuiría a un aporte significativo de estos compuestos.

Por último, la concentración de antocianinas totales fue estadísticamente mayor en la mora azul que en el Cahuiche, 320.8 ± 2.3 mg cianidin-3-glucósido/100 g y 267.1 ± 7.1 mg cianidin-3-glucósido/100 g respectivamente, estos datos representan diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). La ingesta de antocianinas varía dependiendo del país de referencia, por ejemplo, para Estados Unidos el consumo es de 12.5 mg/día, para España 44.1 mg/día y para Holanda es de 64.9 mg/día, siendo diversos frutos como manzanas, peras, uvas y bayas las principales fuentes de contenido (Wu y col., 2006; Zamora-Ros y col., 2011; Cassidy, 2017).

Los resultados referentes a la concentración de compuestos bioactivos encontrados en el presente trabajo, coinciden con los intervalos de valores reportados en la literatura para *V. corymbosum*, en los que se ha cuantificado la concentración de ácido ascórbico (de 41 a 100 mg AA/100 g), compuestos fenólicos (de 261 a 929 mg

EAG/100 g), flavonoides totales (de 50 a 387 mg EQ/100 g) y antocianinas totales (de 25 a 495 mg cianidin-3-glucósido/100 g) (Castrejón *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2015; Gündüz *et al.*, 2015; Kraujalytė *et al.*, 2015).

La concentración de compuestos bioactivos puede variar debido a diferentes razones, como la acidez del suelo, pH, radiación solar, manejo poscosecha y almacenamiento, aun comparando frutos del mismo género y especie (Rodríguez *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2014).

6.5 Actividad antioxidante y actividad quelante

Los valores de la actividad antioxidante de las especies *V. leucanthum* y *V. corymbosum* se muestran en la **Figura 8**. Para las determinaciones de ABTS●+ y DPPH, el cahuiche presentó mayor actividad antioxidante, siendo los resultados estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$) en comparación con la mora azul. Cahuiche presentó $1,035.5 \pm 48.8$ $\mu\text{mol ET}/100\text{g pf}$ y mora azul 764.0 ± 10.9 $\mu\text{mol ET}/100\text{g pf}$ para el método ABTS●+.

Con respecto al método DPPH se encontró un valor para cahuiche de $1,293.6 \pm 28.0$ y para mora azul de 882.9 ± 10.0 $\mu\text{mol ET}/100\text{g pf}$. Dichos valores pueden ser comparados con los reportados en la literatura en diferentes *Vaccinium* (*V. corymbosum* y *V. ashei*) y otros frutos rojos como zarzamora, frambuesa, fresa y cereza (Rossi *et al.*, 2003; Su y Chien, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2014).

Cabe resaltar que la actividad antioxidante puede relacionarse con un alto contenido de compuestos fenólicos, tales como flavonoides y antocianinas, compuestos que confieren una actividad antioxidante importante (Teleszko y Wojdylo, 2015).

Con respecto a la determinación de FRAP, el cahuiche presentó mayor actividad que la mora azul, los resultados refieren diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$), mostrando $1,558.1 \pm 5.8$ y $1,253.6 \pm 21.6$ $\mu\text{mol EFe}^{2+}/100\text{g pf}$ respectivamente. Los resultados antes mencionados pueden corroborarse con otros estudios en donde

se reportan valores encontrados en otras variedades de *Vaccinium* (*V. corymbosum*, *V. uliginosum* y *V. eschenaultii*) en los que oscilan de 486 a 1,694 $\mu\text{mol EFe}^{2+}/100 \text{ g pf}$ (Kraujalyté *et al.*, 2015; Nagulsamy *et al.*, 2015).

La actividad quelante de Fe^{2+} de las especies de *Vaccinium* fue de $51.6 \pm 0.7\%$ y $42.6 \pm 0.6\%$ de inhibición de Fe^{2+} para cahuiche y mora azul respectivamente. Dichos valores mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($P \leq 0.05$).

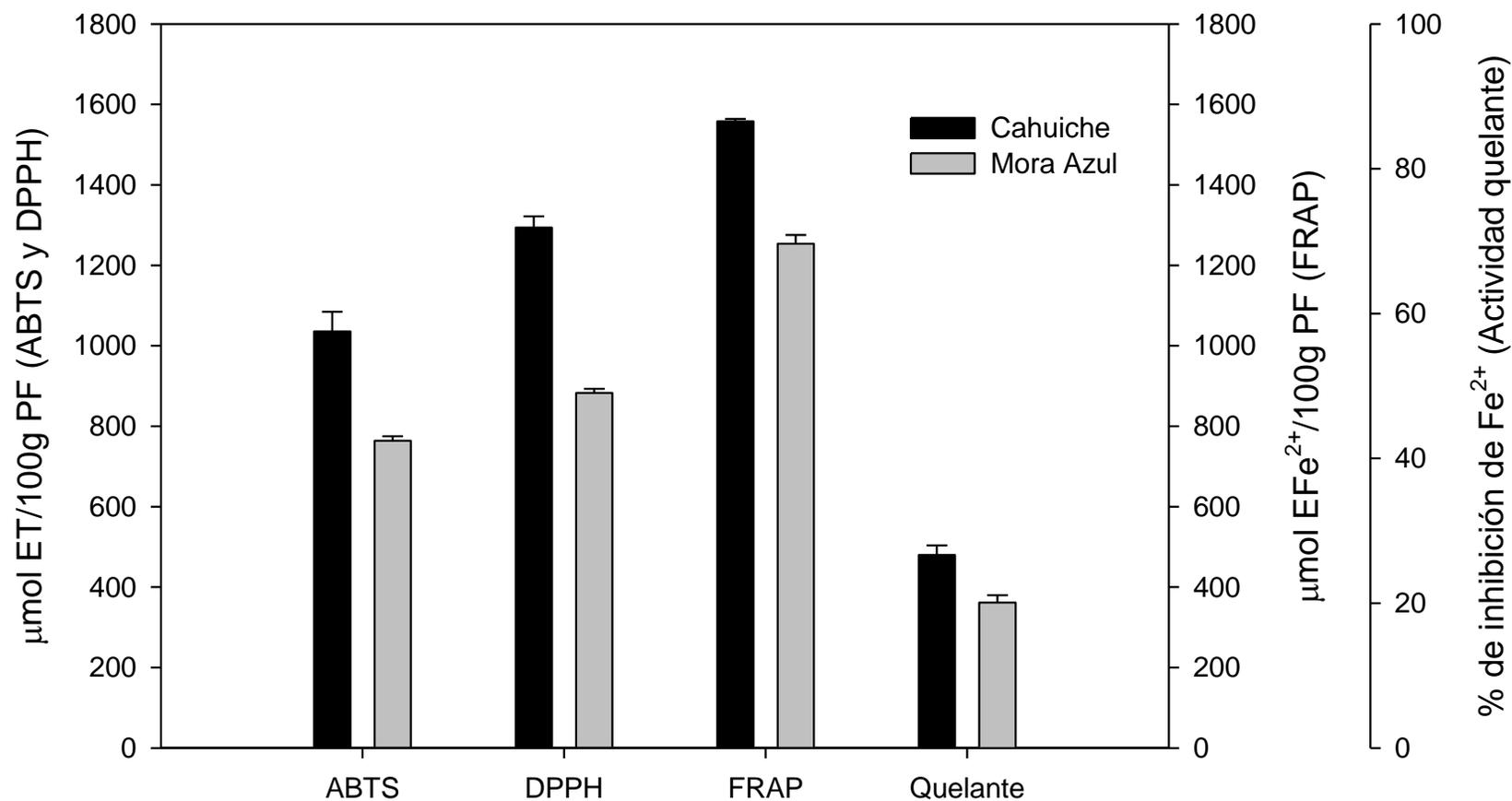
Estos resultados se pueden comparar con otro fruto del género *Vaccinium*, el cual presentó diferente actividad de quelación del 41.4% de inhibición del Fe^{2+} . La actividad quelante puede ser relacionada al contenido de compuestos fenólicos y fibra dietética presentes en la matriz de frutos (Xie, *et al.*, 2008; Pervin, *et al.*, 2013).

Se realizó una correlación entre los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ y se observó lo siguiente:

Para el cahuiche, existió la correlación con el contenido de ácido ascórbico y las determinaciones de FRAP y actividad quelante con $R^2 = 0.90$ y 0.88 , respectivamente, mientras que el contenido de flavonoides totales resultó la correlación con $R^2 = 0.86$ y 0.89 también para FRAP y actividad quelante respectivamente, por último, el contenido de antocianinas totales tuvo correlación con las determinaciones de ABTS y DPPH, con una $R^2 = 0.86$ y 0.96 respectivamente.

Para la mora azul, se presentó la correlación $R^2 = 0.82$ del contenido de ácido ascórbico con la determinación de DPPH, el contenido de fenoles totales resultó la correlación de $R^2 = 0.88$ con la actividad quelante y el contenido de flavonoides totales tuvo correlación $R^2 = 0.82$ con la determinación de DPPH, por último, el contenido de antocianinas totales tuvo correlación $R^2 = 0.72$ con la actividad quelante.

Es importante conocer los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los frutos, por lo que generalmente, se realiza la extracción y separación con diferentes solventes para la identificación de dichos compuestos con actividad bioactiva.



Técnica de determinación de actividad antioxidante

Figura 8. Actividad antioxidante de las especies *V. leucanthum* y *V. corymbosum*.

Etapa 2

6.6 Extracción de compuestos

La extracción por diferentes disolventes en la fruto del *Vaccinium leucanthum* presentó los siguientes rendimientos: hexano 0.4%, acetato de etilo 0.7% y metanol 58.7% de 100 g de peso fresco. La capacidad antioxidante de las extracciones se presenta en la **Tabla 6**.

La capacidad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH fue incrementando su actividad antioxidante en relación al aumento de la polaridad con la que se extrajeron los compuestos.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos del *V. leucanthum*.

Muestra	Determinación	Extracción		
		Hexano	Acetato de etilo	Metanol
<i>V. leucanthum</i>	ABTS●+ (μmol ET/100 g)	819.28 ± 11.89	992.86 ± 6.41	1,016.52 ± 11.71
	DPPH (μmol ET/100 g)	588.65 ± 5.65	576.68 ± 7.83	878.36 ± 5.40
	FRAP (μmol EFe ²⁺ /100g)	1,173.67 ± 4.41	1,137.85 ± 7.04	1,558.11 ± 5.85

ET= Equivalentes de Trolox.

Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas en $P \leq 0.05$

Cabe mencionar que conforme aumentó la polaridad de los disolventes para la extracción de compuestos, también aumentó la capacidad antioxidante por ABTS●+ DPPH y FRAP, esto podría deberse a la mayor concentración de compuestos polares,

como, fenoles, flavonoides y antocianinas, metabolitos secundarios con importante actividad antioxidante (Rodrigues *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2014).

Se buscó una nueva extracción de compuestos fenólicos con etanol, el objetivo fue obtener el mayor rendimiento de dichos compuestos y disminuir la posible toxicidad generada por el metanol ya que a pesar de eliminar los disolventes con rotavapor, pueden quedar remanentes de los disolventes en el extracto estudiado.

Los resultados de las extracciones por etanol y metanol se muestran en la **Figura 9**. En la gráfica se observa que el metanol presenta mayor concentración de compuestos fenólicos a diferencia del etanol. Para comprobar la actividad antioxidante de ambas extracciones, se realizaron las pruebas antioxidantes por ABTS, DPPH y FRAP, los resultados se presentan en la **Figura 10**.

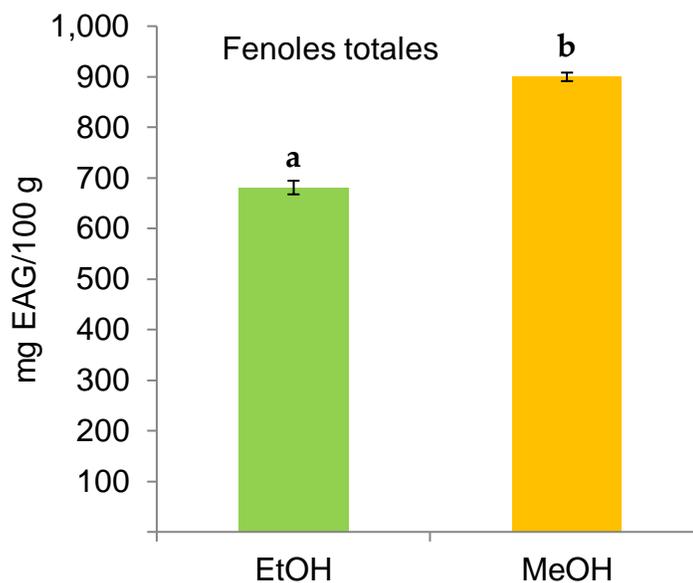


Figura 9. Compuestos fenólicos con extracción etanólica y metanólica.

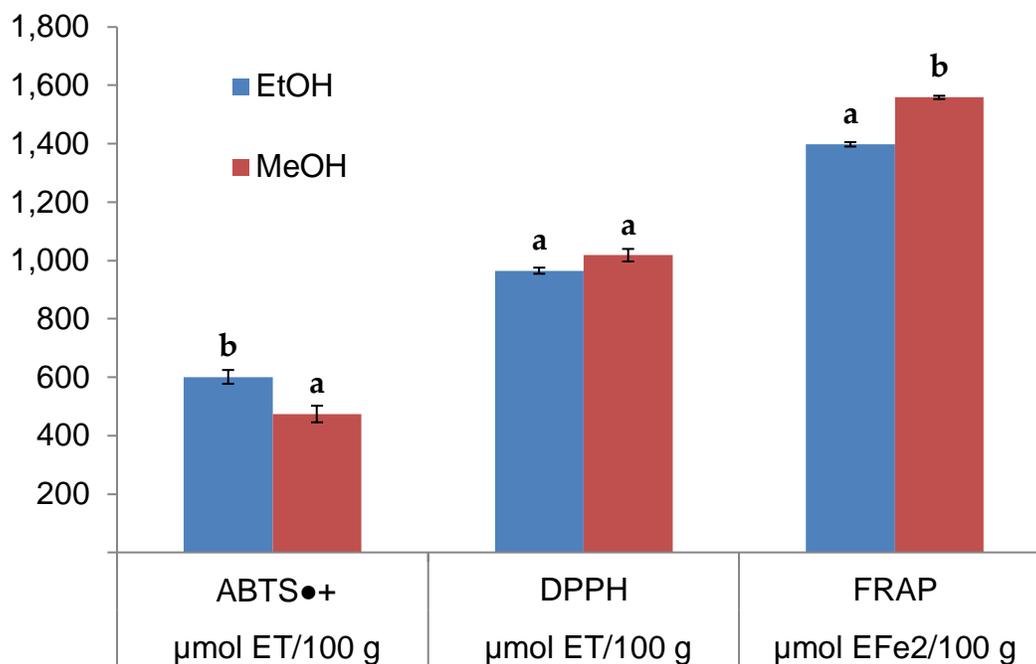


Figura 10. Actividad antioxidante de las extracciones etanólicas y metanólicas.

En la gráfica anterior, se observa que para la prueba por ABTS la extracción por etanol presenta mayor actividad antioxidante superando estadísticamente a la extracción por metanol, sin embargo, para la prueba por DPPH, ambos disolventes no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad antioxidante. Por último, para la prueba por FRAP, la extracción por metanol fue la que presentó mayor actividad antioxidante en comparación a la extracción por etanol.

Para optimizar la extracción de compuestos fenólicos a partir de etanol y metanol, se realizaron nuevas concentraciones de disolventes. Las concentraciones fueron 20, 40, 60, 80 y 100% con agua (v/v). Los resultados se muestran en la **Tabla 7**. La extracción etanólica con agua (60:40, v/v), fue la que obtuvo mayor concentraciones de fenoles, flavonoides y antocianinas, superando estadísticamente a todas las combinaciones de disolventes.

Tabla 7. Extracción etanólica y metanólica de compuestos fenólicos del *V. leucanthum*.

Disolvente	%	Fenoles	Flavonoides	Antocianinas
		mg EAG/100 g	mg EQ/100 g	mg c-3-g/100 g
Etanol	20%	996.44 ±6.94	57.74 ±1.62	37.25 ±0.13
	40%	1,436.44 ±5.09	65.01 ±0.81	115.61 ±0.09
	60%	1,743.11 ±8.39	148.24 ±2.02	220.94 ±0.17
	80%	755.33 ±6.67	139.89 ±3.44	79.64 ±0.06
	100%	580.89 ±13.47	102.99 ±1.21	172.13 ±0.13
Metanol	20%	880.89 ±1.92	54.51 ±5.25	24.41 ±0.01
	40%	857.56 ±6.94	85.62 ±4.85	35.97 ±0.02
	60%	1,620.89 ±6.94	81.89 ±4.04	80.93 ±0.06
	80%	1,136.44 ±11.71	103.26 ±2.03	77.71 ± 0.00
	100%	899.78 ±8.39	45.21 ±3.05	80.93 ± 0.06

Para corroborar la actividad antioxidante de las diferentes extracciones, se procedió a realizar las pruebas por ABTS, DPPH y FRAP, tomando en cuenta el experimento anterior, los porcentajes de disolventes fueron: 40, 50, 60, 70 y 80% de etanol o metanol con agua (v/v).

Los resultados se observan en la **Tabla 8**. Nuevamente, la combinación de etanol con agua (60:40, v/v), fue la que presentó la mayor actividad antioxidante por las tres pruebas utilizadas, superando estadísticamente a las diferentes concentraciones de etanol agua y metanol agua.

Tabla 8. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos del *V. leucanthum*.

Disolvente	%	ABTS	DPPH	FRAP
		mg ET/100 g	mg ET/100 g	mg EFe ₂ /100 g
Etanol	40%	1,031.70 ±7.35	965.03 ±1.78	1,507.00 ±13.33
	50%	1,088.67 ±7.35	985.03 ±0.89	1,329.22 ±15.40
	60%	1,292.09 ±11.02	1,164.46 ±10.58	2,278.67 ±26.03
	70%	902.61 ±11.69	1,037.85 ±1.54	1,317.56 ±12.51
	80%	973.52 ±12.38	1,059.90 ±2.35	1,424.78 ±13.37
Metanol	40%	853.52 ±11.69	622.62 ±6.11	1,163.11 ±17.82
	50%	927.55 ±9.83	786.46 ±10.58	1,686.44 ±19.88
	60%	1,075.23 ±8.19	974.26 ±4.95	1,154.22 ±11.10
	70%	957.15 ±4.20	791.08 ±1.15	1,346.44 ±18.28
	80%	1,004.42 ±17.66	787.62 ±1.15	1,586.44 ±11.34

Debido a los resultados anteriores, se decidió utilizar el extracto de etanol y agua (60:40, v/v), para la separación e identificación de compuestos por HPLC-DAD.

6.7 Fraccionamiento de compuestos.

Se obtuvieron tres fracciones a partir del extracto crudo, las cuales fueron nombradas como Fr1, Fr2 y Fr3, respectivamente y fueron evaluadas con actividad antioxidante por ABTS, DPPH y FRAP, los resultados de los ensayos se muestran en la **Figura 11**.

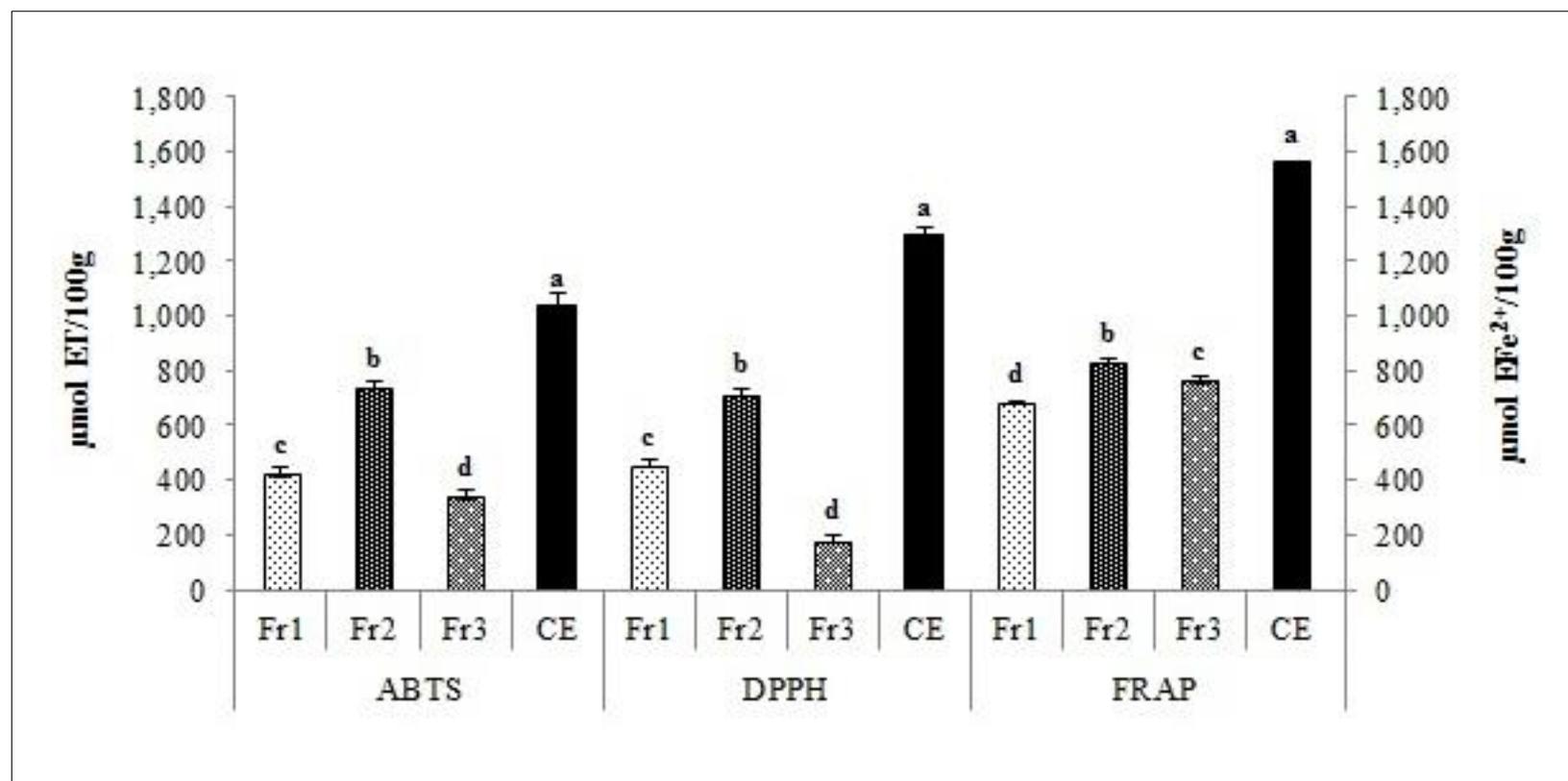


Figura 11. Capacidad antioxidante de las fracciones y el extracto crudo del fruto *V. leucanthum*.

Los resultados para ABTS y DPPH están expresados como μmol equivalentes de Trolox por cada 100 g de peso fresco (pf). Los resultados para FRAP están expresados como μmol equivalentes de Fe^{2+} por cada 100 g pf. Letras diferentes en cada método representan diferencias significativas entre las fracciones ($P \leq 0.05$).

Las tres fracciones presentaron una capacidad antioxidante menor en comparación con la capacidad antioxidante del extracto crudo por los métodos empleados. Los resultados son similares a los reportados por Coklar y Akbulut (2017), quienes observaron un decremento en la capacidad antioxidante en las fracciones del fruto *Mahonia aquifolium* (uva de Oregón), cuando los compuestos fenólicos fueron separados del extracto crudo.

La fracción 2 (Fr2), presentó la mayor capacidad antioxidante por los 3 métodos empleados: ABTS 743.6 ± 12.7 $\mu\text{mol ET}/100$ g pf, DPPH 719.0 ± 10.5 $\mu\text{mol ET}/100$ g pf y FRAP 830.8 ± 8.6 $\mu\text{mol EFe}^{2+}/100$ g pf. Entretanto, la fracción 1 (Fr1), mostró mayor capacidad antioxidante que la fracción 3 (Fr3) por los métodos ABTS y DPPH, sin embargo, la Fr3 exhibió mayor capacidad antioxidante que la Fr1 por el método de FRAP.

Estos resultados son interesantes ya que indican que los compuestos antioxidantes presentes en el fruto de *V. leucanthum* interactúan sinérgicamente entre ellos, sin embargo, cuando se separan disminuye su capacidad antioxidante como sucedió con los estudios en mango y fresa (Reber *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2012).

La capacidad antioxidante mencionada anteriormente puede estar relacionada con la presencia de compuestos fenólicos en el extracto del *V. leucanthum*, razón de ello, se llevó a cabo la identificación de sus compuestos por HPLC-DAD.

6.8 Identificación de compuestos por HPLC-DAD.

En la **Figura 12** (cromatograma A) y la **Tabla 10**, se presentan los 4 ácidos fenólicos identificados en el extracto crudo del *V. leucanthum*. La asignación de los picos 1 a 4 representan el 20.2% del área total, siendo el ácido gálico (pico 2) el ácido fenólico de mayor concentración, representando el 11.7% del área del pico.

La composición de ácidos fenólicos del fruto *V. leucanthum* puede compararse con otros frutos rojos como la uva roja (Kammerer *et al.*, 2004), arándano (Garzón *et al.*, 2010) y mora azul (Moze *et al.*, 2011).

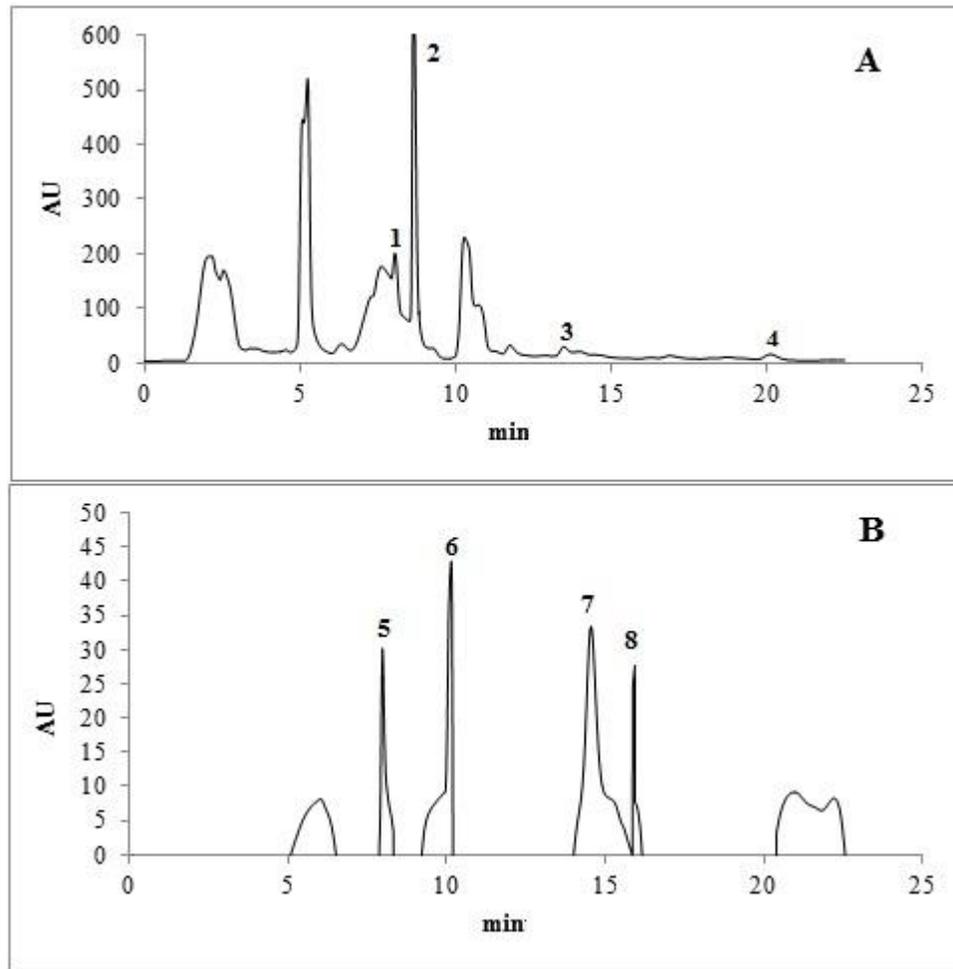


Figura 12. Perfil de HPLC-DAD de los compuestos fenólicos del fruto *V. leucanthum*.

El cromatograma A fue a una longitud de onda de 320 nm, mientras que el cromatograma B, fue leído a una longitud de onda de 520 nm. La asignación de los picos es la siguiente: 1: ácido clorogénico; 2: ácido gálico; 3: ácido cafeico; 4: ácido *p*-Cumárico; 6: Malvidin-3-O-glucósido; 7: Cianidin-3-glucósido; 8: Petunidin-3-glucósido.

En la **Figura 12** (cromatograma B) y la **Tabla 9**, se presentan las 3 antocianinas identificadas en el extracto crudo del *V. leucanthum*. La asignación de los picos 5 a 8 representan el 51.8% del área total, siendo el cianidin-3-glucósido (pico 7) la antocianina más abundante, representando el 17.5% del total del área del pico.

La identificación y concentración de antocianinas en el *V. leucanthum* puede ser comparada con otros estudios realizados a frutos del género *Vaccinium* como *V. meridionale*, *V. uliginosum*, y *V. corymbosum*, en dichos estudios encontraron y

reportaron diferentes composiciones y concentraciones de antocianinas (Garzón et al., 2010; Rui et al., 2011; Wang et al., 2014).

Tabla 9. Compuestos fenólicos y antocianinas del extracto crudo del fruto *V. leucanthum*.

Número de pico	Concentración (mg/g FL)	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención (min)	Asignación de pico
1	1.24	320	7.97	Ácido clorogénico
2	2.19	320	8.67	Ácido gálico
3	0.20	320	13.48	Ácido cafeico
4	0.12	320	20.03	Ácido <i>p</i> -Coumárico
6	2.13	520	10.85	Malvidin-3-O-glucósido
7	3.26	520	14.79	Cyanidin-3-glucósido
8	2.28	520	15.45	Petunidin-3-glucósido

FL: fruto liofilizado.

Debido a la identificación y concentración de compuestos como ácidos fenólicos y antocianinas, el extracto crudo del *V. leucanthum* puede ser referido como un buen candidato para su implementación en un sistema *in vivo*, para conocer los posibles efectos que dichos compuestos puedan ejercer sobre los ratones de la cepa CD1+.

Etapas 3

6.9 Población de estudio

El presente trabajo fue evaluado y aceptado por el Comité Interno Ético para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CIEQUAL), en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en relación a los Principios Básicos Éticos en la Experimentación Animal del Bioterio en el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Para la experimentación *in vivo*, se utilizaron 72 ratones macho de la cepa CD1+ con peso de entre 20 y 25 g, los cuales fueron divididos en 2 grupos, el primero constó de 24 animales destinados para la determinación de la toxicidad subcrónica (DL₅₀) y el segundo grupo de 48 animales para la evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto del cahuiche.

6.10 Toxicidad subcrónica (DL₅₀) del extracto de cahuiche

No se observó letalidad en los animales tratados con el extracto hasta 5,000 mg/kg. No existieron diferencias significativas entre la masa inicial y final de los ratones en experimentación, sin embargo, existieron diferencias significativas en el consumo de alimento y agua entre los grupos de ratones en tratamiento con los grupos control negativo (Veh).

6.11 Citotoxicidad y genotoxicidad del extracto de *Vaccinium leucanthum*

Los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad del extracto de cahuiche (mg/kg) en ratones CD1+, se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Evaluación citotóxica y genotóxica del extracto de *V. leucanthum* en ratones CD1+.

	Citotoxicidad				Genotoxicidad			
	EPC/ENC				ENC-MN/ENC			
	Basal	48 h	96 h	140 h	Basal	48 h	96 h	140 h
Vehículo (SSI)	14.8±1.6	17.8±2.6 ^a	20.6±5.1 ^a	19.6±3.0 ^a	0.4±0.5	0.8±0.8 ^a	0.8±0.8 ^a	0.8±0.4 ^a
EVI 100	17.4±1.3	18.0±2.3	22.2±4.1	17±3.8	0.8±0.8	0.6±0.5	2.2±0.8	1.4±0.5
EVI 300	16.8±2.5	19.8±3.7	20.8±2.7	17.8±3.2	0.8±0.8	1.2±0.8	1.8±0.4	1.2±0.4
EVI 600	16.0±2.4	19.2±1.9	17.8±2.7	19.6±2.7	0.4±0.4	0.6±0.5	1.6±0.5	1.6±0.8
Doxorubicina 15	18.4±2.7	36.0±1.8 ^{b,1}	40.6±3.9 ^{b,1}	41.6±2.7 ^{b,1}	0.8±0.8	5.6±1.1 ^{b,1}	5.4±0.8 ^{b,1}	5.2±1.3 ^{b,1}
EVI 100 + Dox 15	19.0±3.0	29.2±1.4 ¹	26.6±5.0 ¹	33.4±1.5 ¹	0.8±0.8	4.2±0.8	4.8±0.4	3.4±1.1 ¹
EVI 300 + Dox 15	17.8±3.6	17.6±2.7 ¹	23.2±1.9 ¹	21.6±2.0 ¹	0.6±0.5	2.0±0.7 ¹	2.2±0.8 ¹	2.0±0.7 ¹
EVI 600 + Dox 15	19.4±3.5	19.4±3.9 ¹	19.2±2.7 ¹	27.4±2.7 ¹	0.8±0.8	2.2±0.4 ¹	2.2±1.1 ¹	1.8±0.8 ¹

EPC: Eritrocitos Policromáticos; ENC-MN: Eritrocitos Normocrómicos Micronucleados; EVI: Extracto de *Vaccinium leucanthum*; Dox: Doxorubicina. Diferentes letras y números en columnas refieren diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$).

Se evaluó la citotoxicidad y la genotoxicidad de los ratones administrados con extracto de *Vaccinium leucanthum* (EVI) y/o con Doxorubicina (15 mg/kg), la primera medida por la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) por cada 1,000 eritrocitos normocrómicos (ENC) y la segunda, por la relación de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) por cada 1,000 ENC.

El uso de medicamentos antibióticos con la Doxorubicina puede generar el daño a nivel celular y de tejidos, ocasionando de esta manera diversos efectos adversos en la terapia antineoplásica para el caso de carcinomas y tumores (Dantzer *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2016), sin embargo, se han implementado tratamientos coadyuvantes para aminorar o disminuir los efectos ocasionados por los fármacos antineoplásicos (Hajra *et al.*, 2018), de ello, se debe comprobar que dichos tratamientos coadyuvantes no ocasionen perjuicios en los sujetos de estudio.

Existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los efectos de citotoxicidad y genotoxicidad del control positivo (Dox) en comparación con el control negativo (Veh), desde la hora 48 hasta la hora 144 de estudio, se puede decir de esta manera que la Doxorubicina generó daños citotóxicos y genotóxicos (Abdel-Daim *et al.*, 2017) en los ratones de estudio.

Por otra parte, los resultados representan que no existieron diferencias significativas desde la hora 48 hasta la hora 144 de estudio, del control negativo (Veh) en relación a los grupos administrados solo con EVI a 100, 300 y 600 mg/kg, tanto para el efecto de citotoxicidad como para el efecto de genotoxicidad, lo anterior, se puede argumentar que el extracto de cahuiche administrado a los ratones no genera efectos citotóxicos ni genotóxicos a las dosis empleadas.

Por último, en relación a los grupos de ratones coadministrados con EVI (100, 300 y 600 mg/kg) más Doxorubicina contra el control positivo (Dox), los resultados tanto para citotoxicidad y genotoxicidad fueron menores ($P \leq 0.05$), por lo tanto, el extracto de cahuiche en concentraciones de hasta 600 mg/kg puede aminorar considerablemente los daños citotóxicos y genotóxicos producidos por el fármaco Doxorubicina.

6.12 Análisis de capacidad antioxidante en suero

6.12.2 Capacidad antirradical DPPH

La capacidad antioxidante del antirradical DPPH en el suero desproteínizado de los ratones tratados con diferentes dosificaciones de *V. leucanhtum* y Doxorubicina, se muestra en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Capacidad antioxidante de suero desproteínizado de ratones.

	DPPH ($\mu\text{mol ET}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET}$)
Vehículo (SSI)	181.6 \pm 16.3 ^{a,1}	303.5 \pm 5.5 ^{a,1}
EVI 100	232.8 \pm 10.2 ¹	278.1 \pm 3.7 ¹
EVI 300	183.0 \pm 18.7	279.9 \pm 2.7 ¹
EVI 600	272.0 \pm 6.8 ¹	412.6 \pm 3.7 ¹
Doxorubicina 15	115.2 \pm 10.0 ^{b,&}	236.9 \pm 7.2 ^{b,&}
EVI 100 + Dox 15	109.4 \pm 13.3	222.36 \pm 9.0
EVI 300 + Dox 15	166.75 \pm 10.0 ^{&}	215.09 \pm 8.3 ^{&}
EVI 600 + Dox 15	212.8 \pm 14.4 ^{&}	302.9 \pm 2.7 ^{&}

ET: equivalente de Trolox; EVI: Extracto de *Vaccinium leucanthum*; Dox: Doxorubicina.
Diferentes letras y números en columnas refieren diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$).

Existió una disminución del 37% en los valores del control positivo (Dox) en comparación del control negativo (Veh), dicha disminución del antirradical DPPH pudo deberse al aumento del estrés oxidativo ocasionado por la Doxorubicina (Abdel-Daim,

2017), ya que una hipótesis sugiere que el antineoplásico Doxorubicina genera cierto daño a tejidos a nivel funcional y estructural (Hajra *et al.*, 2018).

Se presentó el aumento del 29% y 51% de los valores de los grupos de ratones EVI 100 mg y EVI 600 mg, respectivamente con respecto al Veh, dichos aumentos fueron estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$). Por otra parte, también existió el aumento del 46% y 88% en los valores de DPPH en los grupos de ratones EVI 300 mg + Dox y EVI 600 mg + Dox, respectivamente en comparación con el control positivo, éstas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$), deduciendo de esta manera, que existió un efecto protector a los ratones en relación a mayor dosis de administración del extracto de cahuiche.

6.12.3 Capacidad antioxidante FRAP

La capacidad antioxidante por FRAP, en el suero desproteinizado de los ratones tratados con diferentes dosificaciones de *V. leucanhtum* y Doxorubicina, se muestra en la **Tabla 11**.

Al igual que en la determinación de DPPH, los resultados para FRAP presentaron una disminución del 22% en los valores del control positivo (Dox) en comparación con el control negativo (Veh), ésta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$), la posible causa se podría acuñar al efecto en la depleción de la compuestos antioxidantes y grupos sulfhidrilos (Odom *et al.*, 1992).

Para la comparación de los resultados correspondientes al control negativo con los grupos de ratones administrados sólo con extracto de cahuiche, las concentraciones de 100 mg y 300 mg presentaron una disminución menor al 10%, sin embargo, el grupo administrado con 600 mg obtuvo un aumento estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) en valores de FRAP, éstos resultados sugieren que a mayor dosis del extracto de cahuiche se puede generar un efecto protector o bien mayor capacidad antioxidante en el suero de los ratones de estudio.

Existió el aumento del 28% de los valores para FRAP en el grupo de ratones tratados con extracto de cahuiche y Dox, siendo el EVI 600 mg + Dox comparado con el control positivo (Dox), este aumento en los valores representó una significancia estadística de $P \leq 0.05$, por su parte, los grupos de EVI 100 mg + Dox y EVI 300 mg + Dox no presentaron diferencias con el grupo control positivo, por lo que nuevamente a mayor dosificación (600 mg/kg de masa de ratón) se genera un efecto protector ante ciertos daños ocasionados por el antineoplásico Doxorubicina.

6.13 Análisis en tejidos: corazón e hígado

La Doxorubicina es un antineoplásico ampliamente utilizado para algunos casos de carcinoma (Carvalho *et al.*, 2009; Siswanto *et al.*, 2016), sin embargo, algunos de los efectos adversos que conlleva la utilización de este fármaco, es la cardiotoxicidad y daño hepático (Das *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2018), por lo que es de suma importancia, obtener tratamientos coadyuvantes que aminoren o inhiban en gran medida las reacciones adversas en los individuos que sean tratados con anticancerígenos.

Los resultados de la masa de corazón de los diferentes grupos de ratones se observan en la **Figura 13**.

Como era de esperarse, existió una disminución (48%) estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) de la masa cardíaca del control positivo (Dox) en comparación con el control negativo (Veh). Éste resultado pudo ser debido al efecto cardiotoxico generado por la Doxorubicina. Por otra parte, las diferentes concentraciones del extracto de cahuiche administradas a los ratones no presentaron diferencia significativa, en relación al control Veh, lo que nos podría decir que el EVI hasta concentraciones de 600 mg/kg, no ocasiona cambios en la masa cardíaca.

Por otra parte, se exhibió un aumento estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) del 35% y del 22% para los grupos de ratones EVI 300 + Dox y EVI 600 + Dox, respectivamente, en comparación con el control positivo (Dox). A partir de dosificaciones de 300 mg/kg y hasta 600 mg/kg de extracto de cahuiche, puede existir un efecto protector a la masa cardíaca de los efectos derivados del antineoplásico Doxorubicina.

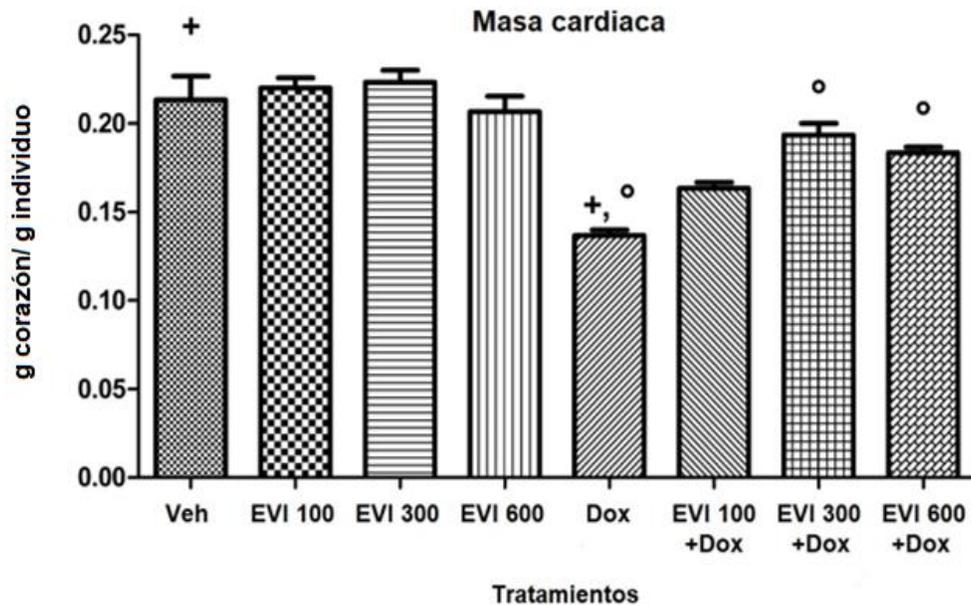


Figura 13. Masa cardiaca de los ratones CD1+ con tratamiento de EVI y/o Dox.

Los resultados de la masa de hígado de los diferentes grupos de ratones se observan en la **Figura 14**.

Al igual que en la masa cardiaca, en la masa hepática mostró una disminución (54%) estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) del control positivo (Dox) en comparación con el control negativo (Veh). Éste resultado pudo ser debido a las reacciones adversas generadas por la Doxorubicina en los ratones tratados. Las concentraciones de 100, 300 y 600 mg/kg del extracto de cahuiche administradas a los ratones no presentaron diferencia significativa, en relación al control positivo, se podría inferir que el extracto de cahuiche hasta dosis de 600 mg/kg, no ocasiona cambios en la masa hepática.

Por otra parte, se ostentó un aumento estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) del 70% y del 60% para los grupos de ratones EVI 300 + Dox y EVI 600 + Dox, respectivamente, en comparación con el control positivo (Dox). A partir de dosificaciones de 300 mg/kg y hasta 600 mg/kg de extracto de cahuiche, puede existir un efecto protector a la masa hepática de los efectos derivados del antineoplásico Doxorubicina.

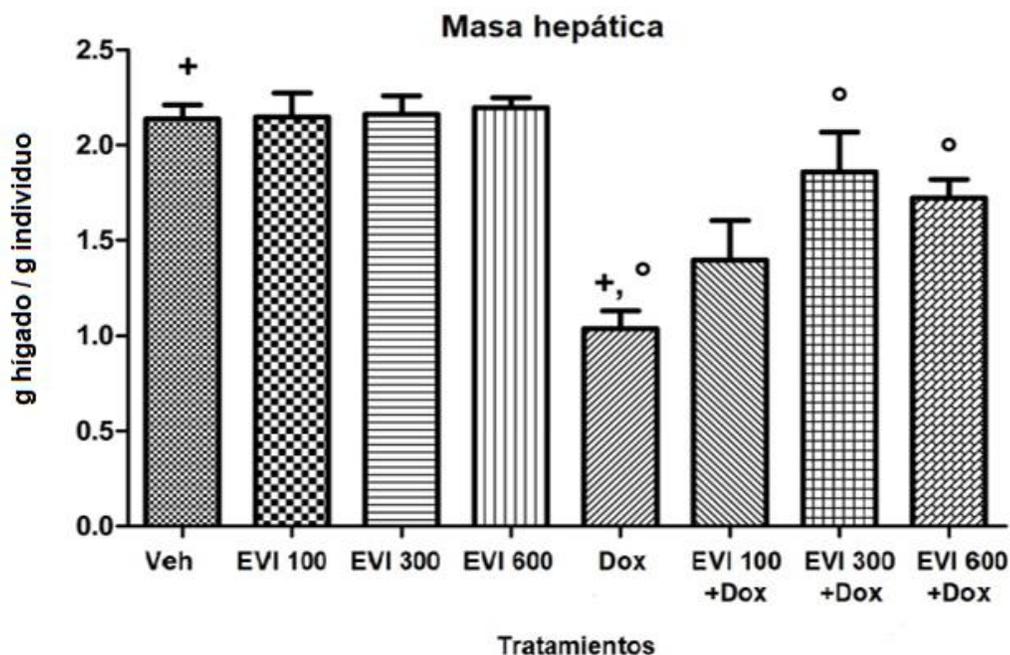


Figura 14. Masa hepática de los ratones CD1+ con tratamiento de EVI y/o Dox.

6.13.1 Actividad de catalasa

La catalasa es una enzima importante involucrada en la desintoxicación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta enzima cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 en oxígeno molecular y dos moléculas de agua. La función fisiológica principal de esta enzima es desintoxicar el H_2O_2 producido como resultado de las reacciones de la deshidrogenasa aeróbica peroxisomal (Li *et al.*, 1997).

La actividad de catalasa en corazón en los ratones de estudio fue la siguiente: existió una disminución del 27% del control positivo (Dox) en relación al control negativo (Veh), ésta disminución es considerada estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). La disminución en los valores de catalasa representa que ocurrió la degradación de ciertos compuestos, como enzimas, encargados de la capacidad antioxidante endógena del tejido en análisis (Mantawy *et al.*, 2014).

Los grupos de ratones con administración de extracto de cahuiche, 100 mg/kg y 300 mg/kg, mostraron un aumento en los valores estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$)

de catalasa, siendo estos aumentos del 32% y 38% respectivamente. Por otra parte, no existió diferencia significativa entre el control negativo y el grupo de ratones administrados con 600 mg/kg de extracto de cahuiche.

Los grupos de ratones coadministrados con extracto de cahuiche y Doxorubicina presentaron un incremento en los valores obtenidos, siendo del 30% para el grupo de 100 mg/kg EVI + Dox y 50% para el grupo de 300 mg/kg EVI + Dox, ambos grupos comparados con el control positivo (Dox), éste aumento es considerado estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$). No existió diferencia significativa entre el control positivo y los ratones administrados con 600 mg/kg EVI + Dox.

La actividad de catalasa en hígado de los ratones control positivo (Dox) fue menor que el control negativo (Veh), tal disminución de los valores fue del 40% ($P \leq 0.05$). No existieron diferencias significativas entre los resultados de los grupos de ratones administrados solo con EVI (100, 300 y 600 mg/kg) en comparación con el control Veh, lo que podría significar que el extracto de cahuiche no genera la degradación de la actividad de catalasa en las dosificaciones de hasta 600 mg/kg.

Por otro lado, los tres grupos de ratones administrados con EVI + Dox, en dosificaciones de 100, 300 y 600 mg/kg, presentaron el aumento del 50, 60 y 55%, respectivamente en los valores ($P \leq 0.05$) referidos por el control Dox. Éste fenómeno nos podría indicar que el extracto de cahuiche confiere efectos protectores hacia el hígado en dosificaciones de hasta 600 mg/kg en la determinación de catalasa.

6.13.2 Lipoperoxidación

La peroxidación lipídica se puede describir en general como un proceso bajo el cual oxidantes como los radicales libres atacan los lípidos que contienen doble enlace (carbono-carbono), especialmente ácidos grasos poliinsaturados (Ayala *et al.*, 2014). La peroxidación lipídica o lipoperoxidación se reconoce como un mecanismo potencial de daño celular (Choi *et al.*, 2007).

La lipoperoxidación en el tejido cardiaco de los ratones fue la siguiente: se presentó un incremento del doble de los valores obtenidos en el control Dox a diferencia del control Veh, esta diferencia es estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). Como se había comentado anteriormente, la Doxorubicina tiene la capacidad de ocasionar reacciones adversas, tal como el estrés oxidativo, causa fundamental para la oxidación del tejido graso inmerso en el corazón (Choi *et al.*, 2007; Abdel-Daim *et al.*, 2017), aunado al efecto de cardiotoxicidad como daño secundario al funcionamiento de la Doxorubicina.

Por otra parte, no existieron diferencias significativas entre los valores de los grupos de ratones administrados solo con EVI (100, 300 y 600 mg/kg) en comparación con el control Veh, lo que podría significar que el extracto de cahuiche no genera lipoperoxidación del tejido cardiaco a dosificaciones de hasta 600 mg/kg.

En relación a los grupos de ratones coadministrados con EVI y Doxorubicina, existieron dos fenómenos, el primero, el aumento del 40% ($P \leq 0.05$) de la lipoperoxidación cardiaca a dosis de 100 mg/kg, la posible causa, el metabolismo propio del fármaco o condiciones externas a la fisiología de los ratones; y el segundo, la disminución del 54% ($P \leq 0.05$) de la lipoperoxidación cardiaca a dosis de 300 mg/kg, por lo que a dosis de 300 mg/kg, se podría asegurar un efecto protector ante la oxidación de los lípidos del corazón, ya que a dosis de 600 mg/kg + Dox, no existieron diferencias significativas con el control Dox.

La lipoperoxidación en el tejido hepático de los ratones fue la siguiente: existió el aumento ($P \leq 0.05$) del doble de los valores en relación a la lipoperoxidación del control Dox a diferencia del control Veh, al igual que en la lipoperoxidación cardiaca, el tejido hepático sufre de las reacciones adversas ocasionadas por la Doxorubicina (Saoudi *et al.*, 2010), lo que podría inferir en el hecho de la oxidación del tejido graso del hígado.

En relación a los grupos de ratones coadministrados con EVI y Doxorubicina, se generó la disminución del 60% ($P \leq 0.05$) de la lipoperoxidación hepática a dosis de 300 mg/kg y la disminución del 50% ($P \leq 0.05$) de la lipoperoxidación hepática a dosis de 600 mg/kg, de esta manera, se podría asegurar un efecto protector ante la oxidación

de los lípidos del hígado en dosis de 300 hasta 600 mg/kg, sin embargo, a dosis de 100 mg/kg no existieron diferencias significativas en comparación con el control Dox.

Etapa 4

6.14 Actividad antioxidante enzimática

Un compuesto con capacidad antioxidante o una enzima antioxidante puede inhibir o prevenir la formación de radicales libres u otras especies reactivas, por lo tanto, tiene la capacidad de defender a las células del estrés oxidativo por medio de la donación de hidrógenos o electrones a las radicales libres o especies reactivas, lo que generaría una especie menos reactiva u oxidante (Debnath *et al.*, 2011).

Las enzimas antioxidantes más comunes que se utilizan en las investigaciones son: catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión (reductasa o peroxidasa), inhibición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico, entre otras. Los ensayos mencionados anteriormente tienen la función de probar la actividad de diversos fármacos, extractos de alimentos o muestras de análisis, de ello que pudieran ser una primera línea de la actividad de dichas sustancias, tal como se presenta a continuación.

6.14.1 Catalasa

Varias especies de oxígeno activo como O_2^- , H_2O_2 y OH^- , resultan de la reducción del oxígeno molecular, y existen numerosas posibles reacciones que permiten que estas especies se interconviertan. El peróxido de hidrógeno, es una sustancia que tiene vida media más larga, proporciona una buena estimación del nivel relativo de oxígeno activo en el sistema. La catalasa se encarga de catalizar la conversión de H_2O_2 a H_2O y O_2 . Las reacciones concertadas desempeñan un papel vital en la defensa contra el daño de los radicales libres (Mader *et al.*, 1980; Ye *et al.*, 2015).

Los resultados de la actividad de catalasa de los extractos del *Vaccinium leucanthum* se observan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Actividad antioxidante enzimática de los extractos de *V. leucanthum*.

	Catalasa (U/mg proteína)	SOD (IC ₅₀ , mg/mL)	H ₂ O ₂ (IC ₅₀ , mg/mL)
Ácido ascórbico	3.4±0.2 ^a	0.4±0.0 ^a	0.9±0.0 ^a
Extracto EOH	2.9±0.3 ^b	3.8± 0.4 ^b	3.2±0.2 ^b
Extracto AcEOt	1.2±0.0 ^d	4.6±0.3 ^c	3.7±0.6 ^c
Extracto Hex	2.2±0.4 ^c	7.2±0.6 ^d	4.8±0.4 ^d

EOH: etanol; AcEOt: acetato de etilo; Hex: hexano.

Diferentes letras en columnas refieren diferencias estadísticamente significativas.

El extracto etanólico fue el que presentó mayor actividad de catalasa, después del control de ácido ascórbico, la actividad de dicho extracto pudo ser referida a los compuestos fenólicos, como antocianinas, sustancias que han reportado un efecto similar a la catalasa en la inhibición del H₂O₂ (Samad *et al*, 2014).

El presente estudio puede ser comparado con un análisis realizado por Samad *et al.*, (2014) en el que realizaron un extracto con etanol en el fruto de *Vaccinium corymbosum* (mora azul) y obtuvieron actividad de catalasa, por lo tanto, los extractos de *Vaccinium* promueven la descomposición del H₂O₂ que puede conducir al daño oxidativo de las biomoléculas celulares (Debnath *et al.*, 2011).

6.14.2 Superóxido dismutasa

Al igual que la catalasa, la SOD es fundamental para el nivel inmediato de H₂O₂ ya que ambas sustancias están involucrados en la producción y utilización de la molécula. Ambas enzimas existen como múltiples formas enzimáticas (isozimas). La existencia de múltiples formas moleculares de SOD, peroxidasa, catalasa y otras enzimas

relacionadas y la variación en la actividad de éstas durante el desarrollo de un tejido celular sugiere que cada isozima puede tener un papel diferente (Gay & Tuzun, 2000).

Los resultados de la actividad de SOD de los extractos del *V. leucanthum* se muestran en la **Tabla 13**.

El extracto etanólico fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición del H_2O_2 , sin embargo, los valores obtenidos fueron menores en comparación con el ácido ascórbico, este resultado es similar a los resultados reportados por Samad *et al.*, (2014), en un extracto etanólico en el fruto *V. corymbosum*.

6.14.3 Inhibición de peróxido de hidrógeno

Las reacciones redox que ocurren de manera natural son cruciales para controlar el sistema metabólico en un ser vivo. Los radicales libres o las especies reactivas de oxígeno (ERO) se introducen en el cuerpo como productos de funciones metabólicas normales o del medio ambiente. Los radicales superóxido, radicales libres hidroxilo y las especies no radicales libres, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son ejemplos de ERO (Ak & Gülçin, 2008).

Los resultados de la inhibición de H_2O_2 de los extractos del *V. leucanthum* se presentan en la **Tabla 13**.

Al igual que en SOD, la inhibición del H_2O_2 por parte de los extractos de *V. leucanthum* fue similar. El extracto etanólico fue el que presentó mayor inhibición del peróxido de hidrógeno, sin embargo, la inhibición fue menor que el control de ácido ascórbico. Los presentes valores pueden ser comparados con los reportados por Hazra *et al.*, (2010), ya que los extractos fenólicos de diferentes frutos, presentaron la inhibición del H_2O_2 , empero, fueron menores que su estándar de comparación, ácido ascórbico.

Los diferentes extractos del *Vaccinium leucanthum* demostraron tener cierta actividad ante radicales, principalmente el peróxido de hidrógeno, de ello, se puede referir que dichos extractos del *V. leucanthum* pueden ser utilizados como agentes antioxidantes

en diversos estudios que requieran la inhibición de agentes oxidantes, sin embargo, se necesita de estudios en células para comprobar que no presenten efectos tóxicos en las líneas de estudio.

6.15 Viabilidad celular *in vitro*

6.15.1 MTT

El ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolium bromida (MTT), es un indicativo de la actividad metabólica celular y su medida se utiliza ampliamente para evaluar la proliferación y la viabilidad celular. El MTT es captado por las células a través de la endocitosis y se reduce a formazán principalmente en el compartimento endosoma/lisosoma. El producto de formazán luego se transporta a la superficie celular por exocitosis, donde aparece como resultado la formación de cristales (Liu *et al*, 1997).

Para verificar que los extractos obtenidos del *Vaccinium leucanthum* no son citotóxicos, se procedió a implementar el ensayo por MTT en diferentes concentraciones así como en diferentes líneas celulares de rata. Los extractos mostraron un incremento de la absorbancia por sí mismos en ausencia de MTT a medida que se incrementaba su concentración. Estos valores de absorbancia provocados por los propios extractos fueron sustraídos de los resultados con MTT.

Los resultados están referidos a una media de los valores controles, considerados el 100%, como se muestra en las **Figuras 15 y 16** en células de rata A7r5 y Ar42J, respectivamente.

Para las células A7r5, el DMSO no redujo la viabilidad celular a concentraciones de 0.5, 1 o 2 %. Estas células parecen más resistentes al efecto del DMSO que las Ar42J.

Los extractos de etanol-agua o acetato de etilo no produjeron descenso significativo de la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones probadas.

El extracto de hexano incrementa la mortandad celular a las 2 concentraciones probadas (0.5 y 1 μM). En ambos casos la viabilidad celular disminuye de forma significativa cuando es comparada con la correspondiente concentración de DMSO (1 y 2% DMSO), por lo que los efectos parecen ser debidos al propio extracto.

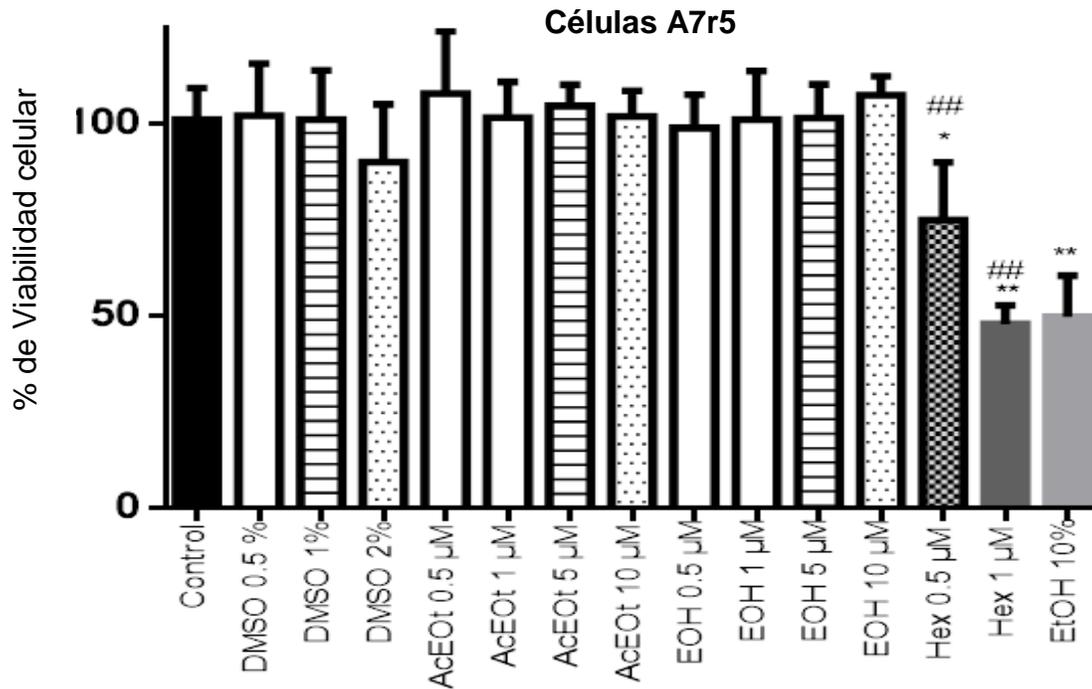


Figura 15. Efecto de los extractos de cahuiche sobre la viabilidad de células A7r5.

* $P < 0.05$ ó ** $P < 0.01$ respecto al control; ## $P < 0.01$ respecto a la correspondiente concentración de DMSO.

Los resultados sugieren que, a las concentraciones de 0.5-10 μM , los extractos de acetato de etilo y de etanol-agua no provocan disminución en la viabilidad celular. Por su parte, el extracto de hexano provoca disminución de la viabilidad tanto a 0.5 μM como a 1 μM . El efecto del extracto de hexano podría deberse a una precipitación del producto que parece observarse durante el tiempo de incubación.

Para las células Ar42J, el DMSO no redujo la viabilidad celular a concentraciones de 0.5 y 1 %, pero si redujo la viabilidad de forma significativa a la concentración de 2%.

El extracto etanol-agua no produjo descenso significativo de la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones probadas. El extracto de acetato de etilo únicamente redujo la viabilidad celular con respecto al control a la concentración de 10 μM . Esta reducción parece ser debida a la concentración de DMSO necesaria para diluirlo, puesto que no hay diferencias significativas entre la viabilidad en presencia de DMSO 2% y Acetato de etilo 10 μM .

El extracto de hexano incrementa la mortandad celular a las 2 concentraciones probadas. Sin embargo, el efecto de la concentración de 0.5 μM parece ser debido a la concentración de DMSO, ya que no hay diferencias significativas con el DMSO 1%. En cuanto a la concentración de 1 μM , la viabilidad celular disminuye de forma significativa cuando es comparada con el efecto del vehículo 2% DMSO, por lo que los efectos parecen ser debidos al propio extracto.

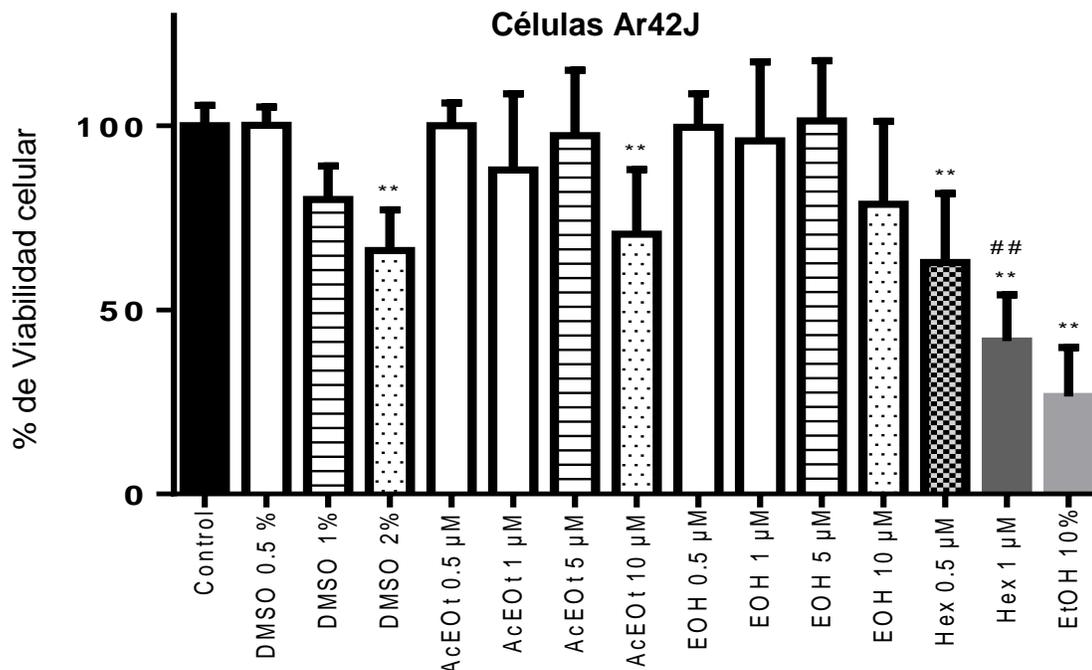


Figura 16. Efecto de los extractos de cahuiche sobre la viabilidad de células Ar42J.

** $P < 0.01$ vs control. ## $P < 0.01$ vs la concentración correspondiente de DMSO (No hay diferencias a $P < 0.05$).

Los resultados parecen indicar que, a las concentraciones de 0.5-10 μM , los extractos de acetato de etilo y de etanol-agua no provocan disminución en la viabilidad celular. Por su parte, el extracto de hexano no provoca disminución de la viabilidad a 0.5 μM , pero sí a 1 μM .

Al igual que en el caso de las A7r5, el efecto del extracto de hexano podría deberse a una precipitación del producto que parece observarse durante el tiempo de incubación.

7 CONCLUSIONES

El fruto *Vaccinium leucanthum* (cahuiche) presenta una mayor concentración de compuestos de polaridad alta que de polaridad media o baja.

El cahuiche representa una fuente importante de fibra, carbohidratos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante, superando a *Vaccinium corymbosum* (mora azul), uno de los frutos comerciales de su misma especie.

Las propiedades fisicoquímicas y nutrimentales del cahuiche y su consumo representan un potencial aporte benéfico para la salud humana como un fruto con propiedades funcionales y que podría ser considerado para ser cultivado industrialmente.

El extracto hidroetanólico del cahuiche es aparentemente inocuo, así mismo, presentó efectos protectores en los ratones administrados con Doxorubicina como agente antineoplásico con efecto cardiotoxico.

Los extractos hidroetanólicos y de acetato de etilo del cahuiche no son citotóxicos en tratamientos hasta 100 µg/mL, con respecto a la viabilidad celular por MTT en células A7r5 y Ar42J.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Daim, M. M., Kilany, O. E., Khalifa, H. A., & Ahmed, A. A. (2017). Allicin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation, an apoptosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 80(4): 745-753.
- Abushouk, A. I., Ismail, A., Salem, A. M., Afifi, A. M., & Abdel-Daim, M. M. (2017). Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 90(1): 935-946.
- Ak, T., & Gülçin, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*. 174(1): 27-37.
- Alonso-González, E., Torrado-Agrasar, A., Pastrana-Castro, L. M., Orriols-Fernández, I., & Pérez-Guerra, N. (2011). Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates. *Food Research International*. 44(5): 1419-1426.
- Anttonen, M. J., & Karjalainen, R. O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18(8): 759-769.
- AOAC. Official Methods of Analysis; "930.15 para humedad; 940.26 para cenizas; 920.151 para sólidos solubles totales; 981.12 para pH; 942.15 para acidez titulable; 920.67 para valor energético; 920.152 para proteína; 954.02 para extracto etéreo; 932.02 para fibra cruda; y 925.35 para carbohidratos asimilables". *AOAC International*, 16 ed. 1990.
- Asp, N. G., Johansson, C. G., Halmmer, H., & Siljeström, M. (1998). Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31(1): 476-482.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 360438. 31 pages.
- Ayala-Garza, P. (2004). Fibra dietética: conceptos actuales y aplicaciones terapéuticas. *Avances*. 2(4): 12-14.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1): 70-76.
- Boyle, P., Boffetta, P., & Autier, P. (2008). Diet, nutrition and cancer: public, media and scientific confusion. *Annals of Oncology*. 19(10):1665-1667.
- Benítez-Páez, A., Gómez Del Pulgar, E. M., Kjølbæk, L., Kirchner-Brahe, L., Astrup, A., Larsen, L., & Sanz, Y. (2016). Impact of dietary fiber and fat on gut microbiota re-modeling and metabolic health. *Trends in Food Science Technology*. 57(Part B): 201-212.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52(1): 302-310.

-
- Butterfield, D. A., Di-Domenico, F., & Barone, E. (2014). Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1842(2): 1693-1706.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: The good, The bad and The ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*. 16(25): 3267-3285.
- Casanueva, E., Kaufer, M., & Perez, A. B. (2008). Nutriología médica/ Medical Nutriología: Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V. 822 pages.
- Cassidy, A. (2017). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*. S0098-2997(17): 30044-30044.
- Castrejón, A., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L., & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*. 109(3): 564-572.
- Chang-Ho, J., Sung-Gil, C., & Ho-Jin, H. (2008). Analysis of Nutritional Compositions and Antioxidative Activities of Korean Commercial Blueberry and Rapsberry. *The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 37(11): 1375-1381.
- Chavarría, S. (2002). Definición y criterios de Obesidad. *Nutrición Clínica*. 5(4): 236-240.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49(3): 481-93.
- Chen, G., Li, C., & Chen, K. (2016). Chapter 6 – Fructooligosaccharides: A review on Their Mechanisms of Action and Effects. *Studies in Natural Products Chemistry*. 48(1): 209-229.
- Choi, E. H., Chang, H. J., Cho, J. Y., & Chun, H. S. (2007). Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*. 45(10): 1873-1881.
- Choi, S. H., Ahn, J. B. Kozukue, N., Levin, C. E., & Friedman, M. (2011). Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of Jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 59(12): 6594-6604.
- Chrczcanowicz, J., Gawron, A., Zwolinska, A., de Graft-Johnson, J., Krajewski, W., & Krol, M. (2008). Simple method for determining human serum 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity—possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 46(3): 342-349.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., & Lee, C. Y. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(10): 1715-24.

- Cocetta, G., Karppinen, K., Suokas, M., Hohtola, A., Häggman, H., & Spinardi, A. (2012). Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *Journal of Plant Physiology*. 169(11): 1059-1065.
- Cohen, G., Dembiec, D., & Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*. 34(1): 30-38.
- Coklar, H., & Akbulut, M. (2017). Anthocyanins and phenolic compounds of *Mahonia aquifolium* berries and their contributions to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 35(1): 166-174.
- Contreras, R., Köhler, H., Pizarro, M., & Zúñiga, G. (2015). *In vitro* cultivars of *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*) are a Source of Antioxidant Phenolics. *Antioxidants*. 4(1): 281-292.
- Cortés, R., Chiralt, B., & Puente, D. (2005). Alimentos Funcionales: Una historia con mucho presente y futuro. *Redalyc*. 12(1): 5-14.
- Dantzer, R., Meagher, M. W., & Cleeland, C. S. (2012). Translational approaches to treatment-induced symptoms in cancer patients. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 9(7): 424-426.
- Das, S., Filippone, S. M., Williams, D. S., Das, A., & Kukreja, R. C. (2016). Beet root juice protects against doxorubicin toxicity in cardiomyocytes while enhancing apoptosis in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 421(1-2): 89-101.
- Debnath, T., Park, P. J., Deb-Nath, N. C., Samad, N. B., Park, H. W., & Lim, B. O. (2011). Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chemistry*. 128(3): 697-703.
- de Souza, V. R., Pereira, P. A., da Silva, T. L., de Oliveira, L., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*. 156(1): 362-368.
- Drahos, J., Ricker, W., Parsons, R., Pfeiffer, R. M., Warren, J. L., & Cook, M. B. (2015). Metabolic Syndrome Increases Risk of Barrett Esophagus in the Absence of Gastroesophageal Reflux: An Analysis of SEER-Medicare Data. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 49(4): 282-288.
- Dürüst, N., Dogan, S., & Dürüst, Y. (1997). Ascorbic acid and element contents of food of Trabzon (Turkey). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(6): 2085-2087.
- Escudero-Álvarez, E., & González-Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*. 21(Supl. 2): 61-72.
- Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53(17): 6896-6902.
- Fernandez-Pancho, M. S., Villano, D., Troncoso, M. A., & Garcia-Parrilla, C. M. (2008) Antioxidant activity of phenolic compounds from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(7): 649-671.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 136(5): E359-E386.

-
- Fuentes-Cervantes, I., Villavicencio-Nieto, M., & Pérez-Escandón, B. (2013). Plantas medicinales de Omitlán, Hidalgo, México. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. 17(2): 129-135.
- García-Perís, P. (2001). Nutrición en atención primaria. Nutrición y función intestinal: Fibra dietética. *Laboratorio Novartis*. Madrid, España. 213-220.
- García-Perís, P., Bretón-Lesmes, I., de la Cuerda-Compes, C., & Camblor-Álvarez, M. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*. 17(Supl. 2): S11-S16.
- Garzón, G. A., Narváez, C. E., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2010). Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chemistry*. 122(4): 980-986.
- Gay, P. A., & Tuzun, S. (2000). Temporal and spatial assessment of defense responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57(5): 201-210.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determinations of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5): 1370-1373.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F1.2.1-F1.2.13.
- González, R., Dávila, A., & Santana, J. A. (2015). Visión panorámica de las enfermedades crónico degenerativas. *Revista Internacional de Acupuntura*. 9(2): 57-69.
- Goth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity, and revision of reference range *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 196(2-3): 143-151.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., & Pushpangadan, P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology*. 99(2): 165-178.
- Gündüz, K., Serçe, S., & Hancock J. F. (2015). Variation among highbush and rabbiteye cultivars of blueberry for fruit quality and phytochemical characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*. 38(1): 69-79.
- Hajra, S., Patra, A. R., Basu, A., & Bhattacharya, S. (2018). Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 101(1): 228-243.
- Hancock, F., Beaudry, R., & Luby, J. (2003). Fruits of temperate climates/Fruits of the *Ericaceae*. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition).
- Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., & Mandal, N. (2010). Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10:20, 15 pages.

-
- IFIC: International Food Information Council. (2008). Fiber Fact Sheet. En línea: <http://www.foodinsight.org/Content/6/FINAL%20IFICFndtnFiberFactSheet%2012%2021%2008.pdf>. Fecha de acceso: marzo 2016.
- Ishino, K., Mutoh, M., Totsuka, Y., & Nakagama, H. (2013). Metabolic syndrome: a novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Letters*. 334(1): 56-61.
- Janicki-Deverts, D., Cohen, S., Matthews, K. A., Gross, M. D., & Jacobs, D. R. (2009). Socioeconomic status, antioxidant micronutrients, and correlates of oxidative damage: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Psychosomatic Medicine*. 71(5): 541-548.
- Jiang, H., Che, D., Qin, G., Kong, X., & Farouk, M. H. (2017). Effects of dietary non-fiber carbohydrates on composition and function of gut microbiome in monogastrics: a review. *Protein and Peptide Letters*. 24(5): 432-441.
- Jones, J. B., & Case, V. W. (1990). Sampling handling and analyzing plant tissue samples, in: Westerman RL, (3 Eds.), Soil testing and plant analysis. *Soil Science Society of America Inc.* Madison, Wisconsin USA. 389-427.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(14): 4360-4367.
- Kim, E. K., Kwon, K. B., Song, M. Y., Seo, S. W., Park, S. J., & Ka, S. O. (2007). Genistein protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 278(1-2): 18-28.
- Klatsky, A. L. (2010). Alcohol and cardiovascular health. *Physiology & behavior*. 100(1): 76-81.
- Kosmala, M., Zduńczyk, Z., Karlińska, E., & Juśkiewicz, J. (2014). The effects of strawberry, black currant, and chokeberry extracts in a grain dietary fiber matrix on intestinal fermentation in rats. *Food Research International*. 64(1): 752-761.
- Kovacic, P., & Somanathan, R. (2012). Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Current Neuropharmacology*. 10(4): 289-302.
- Kraujalyté, V., Rimantas, P., Pukalskas, A., Cesonienė, L., & Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*. 108(1): 583-590.
- Krishna, G., & Hayashi, M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 455(1-2): 155-166.
- Landete, J. M. (2012). Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52(10): 936-948.

-
- Lascurain, M., Avendaño, S., del Amo, S., & Niembro, A. (2010). Guía de frutos silvestres comestibles en Veracruz. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal. *Conafor-Conacyt*. México.
- Li, G., Chen, Y., Saari, J. T., & Kang, Y. J. (1997). Catalase-overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Physiology*. 273(3 Pt 2): H1090-1095.
- Li, M. J., Ma, F. W., Zhang, M., & Pu, F. (2008). Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant Science*. 174(6): 606-612.
- Li, R., Wang, P., Guo, Q., & Wang Z. (2011). Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry. *Food Chemistry*. 125(1): 116-120.
- Lisi, S., D'Amore, M., & Sisto, M. (2014). ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity. *Immunology Letters*. 162(1 Pt A): 159-169.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 69(2): 581-593.
- Lizaur, A., Marván, L., & Palacios, B. (2008). Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. 2ª edición. *Fomento de Nutrición y Salud*, A.C. México. 84 pages.
- Lohachoopol, V., Szrednicki, G., & Craske, J. (2004). The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004(5): 248-252.
- Lopes da-Silva, F., Escribano-Bailon, M. T., Perez-Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*. 40(2): 374-382.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. 54(4): 275-87.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(4): 840-860.
- Mader, M., Ungemach, J., & Schloss, P. (1980). The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta*. 147(5): 467-470.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols, food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5): 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1 Suppl): 230S-242S.

- Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M., & El-Demerdash, E. (2014). Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress: inflammation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 728(1): 107-118.
- Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*. 73(3): 321-325.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47(3): 469-474.
- Maskan, M., (2001). Kinetics of color change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*. 48(2): 169-175.
- Mason, R. P. (2016). Imaging free radicals in organelles, cells, tissue, and *in vivo* with immuno-spin trapping. *Redox Biology*. 8(1): 422-429.
- Mazza, G. (2000). Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza. *Editorial Acribia S. A. España*. 97 pages.
- Meyer, S., Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Montpied, P., Demotes-Mainard, S., & Bidel, L. P. (2006). Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon-nitrogen balance within leaves?. *Plant, Cell & Environment*. 29(7): 1338-1348.
- Meyskens, F. L., & Szabo, E. (2005). Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 14(6): 1366-1369.
- Mongeau, R., & Brooks, S. P. (2016). Dietary Fiber: Properties and Sources. *Encyclopedia of Food and Health*. Reference Module in Food Science. 404-412.
- Monser, E. R. (2000). Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, Vitamin E, selenium, and carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*. 100(9): 1008-1009.
- Monsuez, J. J. (2012). Detection and prevention of cardiac complications of cancer chemotherapy. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 105(11): 593-604.
- Morales, F., & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*. 72(1): 119-125.
- Moze, S., Polak, T., Gasperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Poklar Ulrich, N., & Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(13): 6998-7004.
- Mudnic, I., Budimir, D., Modun, D., Gunjaca, G., Generalic, I., & Skroza, D. (2012). Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. *Journal of Medicinal Food*. 15(3): 315-321.
- Murphy, M. M., Barraj, L. M., Herman, D., Bi, X., Cheatham, R., & Randolph, R. K. (2012). Phytonutrient intake by adults in the United States in relation to fruit and vegetable consumption. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 112(2): 222-229.

-
- Myburgh, K. (2014). Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress?. *Sports medicine*. 44(1): 57-70.
- Nagulsamy, P., Ponnusamy, R., & Thangdraj, P. (2015). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer properties of *Vaccinium leschenaultii* Wight: A therapeutic supplement. *Journal of Food and Drug Analysis*. 23(3): 376-386.
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 30(2): 134-144.
- Nowson, C. A., & MacGregor, G. A. (2006). Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet*. 367(9507): 320-326.
- Odom, A. L., Hatwig, C. A., Stanley, J. S., & Benson, A. M. (1992). Biochemical determinants of Adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochemical Pharmacology*. 43(4): 831-836.
- Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R. R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., & González-Aguilar, G. A. (2012). Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. *Molecules*. 17(11): 12657-12664.
- Pappalard, G., & Lusk, J. (2016). The role of beliefs in purchasing process of functional foods. *Food Quality and Preference*. 53(1): 151-158.
- Pastrana, L., González, R., Estévez, N., Pereira, L., Rodríguez-Amado, I., Fuciños, P., Fuciños, C., Rúa, M. L., Alonso, E., & Troncoso, R. (2017). 7-Functional Foods. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Food and Beverages Industry. 165-200.
- Peluso, I., & Palmery, M. (2015). Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand?. *Biomedical Pharmacotherapy*. 71(1): 102-107.
- Pervin, M., Hasnat, Md. A., & Lim, B. O. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 3(6): 444-453.
- Prencipe, F. P., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 89(1): 257-267.
- Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofi, E., McEwen, J., O'Brian, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(1): 2686-2693.
- Pulgarón, E. R. (2013). Childhood obesity: a review of increased risk for physical and psychological comorbidities. *Clinical Therapeutics*. 35(1): A18-32.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2(2): 219-236.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10): 1231-1237.
- Reber, J. D., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2011). Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 62(5): 445-452.
- Reitman, S., & Frankel, S. A. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. 28(1): 56-63.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology & Medicine*. 49(11): 1603-1616.
- Rinaldi, M., Caligiani, A., Borgese, R., Palla, G., Barbanti, D., & Massini, R. (2013). The effect of fruit processing and enzymatic treatments on pomegranate juice composition, antioxidant activity and polyphenols content. *LWT - Food Science and Technology*. 53(1): 355-359.
- Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenbach I., Gonzaga, L., Mendes, C., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Food Science and Technology (Campinas)*. 31(4): 911-917.
- Rombeau, J. (2004). Investigations of short-chain fatty acids in humans. *Clinical Nutrition*. 1(Supl. 2): S19-S23.
- Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo-Scalzo, R., Nani, R., & Torreggiani, D. (2003) Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*. 36(1): 999-1005.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Shene, C., Sineiro, J., & Nuñez, M. J. (2007). Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: Almond hulls and grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(25): 10101-10109.
- Rui, L., Ping, W., Qing-qj, G., & Zhen-yu, W. (2011). Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry. *Food Chemistry*. 125(1): 116-120.
- Runch, R. J., Cheng, S. J., & Klauning, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 10(6): 1003-1008.
- Samad, N. B., Debnath, T., Ye, M., Hasnat, M. A., Lim, B. O. (2014). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(10): 807-815.
- Saoudi, M., Abdelmouleh, A., Kammoun, W., Ellouze, F., Jamoussi, K., & El-Feki, A. (2008). Toxicity assessment of puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* from Tunisian coast. *Comptes Rendus Biologies*. 331(8): 611-616.

- Saoudi, M., Allagui, M. S., Abdelmouleh, A., Jamoussi, K., & El-Feli, A. (2010). Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 62(6): 601-605.
- Šaponjac, V. T., Čanadanović-Bruneta, J., Četković, G., Djilas, S., & Četojević-Siminb, D. (2015). Dried bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract fractions as antioxidants and cancer cell growth inhibitors. *LWT – Food Science and Technology*. 61(2): 615-621.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 130(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits Compositional elements biochemical activities and the impact of their intake on human health performance and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(3): 627-629.
- Sen, C. K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 33(3): 368-370.
- Sharma, A. N., Bauer, I. E., Sanches, M., Galvez, J. F., Zunta-Soares, G. B., & Quevedo, J. (2014). Common biological mechanisms between bipolar disorder and type 2 diabetes: Focus on inflammation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 54(1): 289-298.
- Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87(1): 4-14.
- Siswanto, S., Arozal, W., Juniantito, V., Grace, A., Agustini, F. D., & Nafrialdi, (2016). The effect of mangiferin against brain damage caused by oxidative stress and inflammation induced by doxorubicin. *HAYATI Journal of Biosciences*. 23(2): 51-55.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(10): 24673-24706.
- Sofi, F., & Ródică, M. (2016). Nutrition and prevention of chronic-degenerative diseases. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 8(1): 713-717.
- Sözgen, K., Tütem, E., Akyüz, E., Özen, S., & Apak, R. (2016). Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. *Talanta*. 147(1): 162-168.
- Su, M. S., & Chien, P. J. (2007). Antioxidante activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*. 104(1): 182-187.
- Symonowicz, M., Sykula-Zajac, A., Lodyga-Chruscinska, E., Rumora, I., & Straukas, M. (2012). Evaluation of polyphenols and anthocyanins contents in black chokeberry-*Photinia melanocarpa* (Michx.) fruits extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 69(3): 381-387.
- Teleszko, M., & Wojdyło, A. (2015). Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods*. 14(0): 736-746.
- Thomas, P. R., & Eart, R. (1994). Enhancing the food supply. *Opportunities in the Nutrition and Food Sciences*. Washington, D.C. NAP. 98-142.

- Torres, J., & Bobet, R. (2001). New flavanol-derivatives from grape (*Vitis vinifera*) by products. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10): 4627-4634.
- Trevisi, L., Pinhin, I., Bazzan, S., & Luciani, S. (2006). Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. *FEBS Letters*. 580(11): 2769-2773.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenol. *Nutrients*. 2(12): 1231-1246.
- Vassalle, C., Masini, S., Carpeggiani, C., L'Abbate, A., Boni, C., & Zucchelli, G. (2004). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM*. 42(1): 84-89.
- Verfaillie, T., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer Letters*. 332(2): 249-264.
- Vu, K. D., Carlettini, H., Bouvet, J., Côté, J., Doyon, G., & Sylvain, J. F. (2012). Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. *Food Chemistry*. 132(2): 959-967.
- Wagner & Brath. (2012). A global view on the development of non-communicable diseases. *Preventive Medicine*. 54(Suppl): S38-S41.
- Wahlqvist, M. L. (2004). Nutrition and prevention of chronic diseases: a unifying eco-nutritional strategy. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. 14(1): 1-5.
- Wang, E., Yin, Y., Xu, C., Liu, J. (2014). Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*. 1327(1): 39-48.
- Wang, H. C., Pao, J., Lin, S. Y., & Sheen, L. Y. (2012). Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1271(1): 44-52.
- Wang, L., Wang, Z., & Li, X. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Malus baccata* (Linn.) Borkh, using response surface methodology. *Journal of Separation Science*. 36(9-10): 1652-1658.
- Willcox, J. K., Catignani, G. L., & Roberts, L. J. (2003). Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*. 34(7): 795-799.
- Williamson, G., & Holst, B. (2008). Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *The British Journal of Nutrition*. 99(1): Suppl 3:S55-58.
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., & Waksmundzka-Hajnos M. (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 78(1): 39-49.
- World Health Organization, (2014). Global Status Report on Non-Communicable Diseases 2014.

- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 54(11): 4069-4075.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 111(2): 370-376.
- Xu, F., Xi, Z., Zhang, H., Zhang C., & Zhang, Z. (2015). Brassinosteroids are involved in controlling sugar unloading in *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' berries during véraison. *Plant Physiology and Biochemistry*. 94(1): 197-208.
- Yang, J. G., Liu, B. G., Liang, G. Z., & Ning, Z. X. (2009). Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. *Molecules*. 14(1): 46-52.
- Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1850(8): 1607-1621.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 53(18): 7320-7329.
- Yu, J., Wang, C., Kong, Q., Wu, X., Lu, J. J., & Chen, X. (2018). Recent progress in doxorubicin-induced cardiotoxicity and protective potential of natural products. *Phytomedicine*. 40(1): 125-139.
- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Lujan-Barroso, L., Slimani, N., Romieu, I., Touillaud, M., Kaaks, R., Teucher, B., Mattiello, A., Grioni, S., Crowe, F., Boeing, H., Forster, J., Quiros, J. R., Salvini, S., Amiano, P., Riboli, E., & Gonzalez, C. A., (2011). Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *British Journal of Nutrition*. 106(7): 1090-1099.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64(4): 555-559.
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., & Schoneveld, O. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem-Biol Interactions*. 188(2): 334-339.
- Zielinska, M., & Michalska, A. (2016). Microwave-assisted drying of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits: Drying kinetics, polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity, colour and texture. *Food Chemistry*. 212(1): 671-680.
- Zoratti, L., Jaakola, L., Häggman, H., & Giongo, L. (2015). Anthocyanin Profile in Berries of Wild and Cultivated *Vaccinium* spp. along Altitudinal Gradients in the Alps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(39): 8641-8650.
- Zorenc, Z., Veberic, R., Stampar, F., Koron, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). White versus blue: Does the wild 'albino' bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) differ in fruit quality compared to the blue one?. *Food Chemistry*. 211(1): 876-882.