

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de
Biosistemas



**Optimización estadística de
subproductos de interés en la salud
humana derivados de *Synsepalum
dulcificum* D. y plantas similares,
utilizando machine learning**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Josefa Antonia Quiroz Troncoso
Ingeniera en Biotecnología

Madrid, 2024



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,
Alimentaria y de Biosistemas

Doctorado en Sistemas Complejos

**Optimización estadística de
subproductos de interés en la salud
humana derivados de *Synsepalum
dulcificum* D. y plantas similares,
utilizando machine learning**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Josefa Antonia Quiroz Troncoso
Ingeniera en Biotecnología

Bajo la dirección de:

Dr. Javier Ricardo Galeano Prieto
Dra. María del Carmen Ramírez Castillejo

Madrid, 2024

Título: < Optimización estadística de subproductos de interés en la salud humana derivados de *Synsepalum dulcificum* D. y plantas similares, utilizando machine learning>

Autor: Josefa Antonia Quiroz Troncoso

Programa de Doctorado: Sistemas Complejos

Dirección de tesis:

Dr. Javier Ricardo Galeano Prieto, Catedrático de Universidad, Universidad Politécnica de Madrid.

Dra. María del Carmen Ramírez Castillejo, Profesora Titular de Universidad, Universidad Politécnica de Madrid.

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

“Esta tesis ha sido financiada por las Ayudas para la realización de doctorados industriales de la Comunidad de Madrid IND2019/BIO-17192”

<A mi amor, Nicolás alegría >

Agradecimientos

Al llegar al final de este doctorado, me invade una mezcla de emociones y reflexiones sobre el increíble viaje que ha representado. Estudiar en un país extranjero ha sido, sin duda, una de las experiencias más profundas y transformadoras de mi vida. Cada día ha sido una oportunidad para aprender, para enfrentar desafíos que muchas veces parecían insuperables, y para encontrar en mí misma la fortaleza para seguir adelante. He luchado incansablemente, con la esperanza de que mi esfuerzo haga sentir orgullosa a mi familia. Aunque el periodo de escritura de esta tesis fue una prueba agotadora, cada obstáculo superado reafirmó mi pasión por la ciencia, especialmente durante los experimentos, que siempre lograban devolverme la sonrisa. Espero poder seguir compartiendo experiencias junto a ti codo a codo.

Quiero expresar mi gratitud más profunda a aquellas personas sin las cuales este sueño no habría sido posible. Carmen Ramírez, no tengo palabras suficientes para agradecerte. Eres mucho más que una jefa; eres una amiga, una mentora, una guía que creyó en mí cuando más lo necesitaba. Tu decisión de traerme desde Chile a España cambió mi vida para siempre, y no solo apostaste por mis habilidades, sino que me apoyaste en cada paso, brindándome el cariño y la confianza que solo alguien con un corazón tan grande como el tuyo podría dar. Tu fe en mí y tu amistad incondicional son regalos que atesoro profundamente, y siempre llevaré en mi corazón el inmenso privilegio de haberte conocido.

A mis jefes de empresa, Loan Bensadon y Guillermo Milans del Bosch, no tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí. Desde que comenzamos a trabajar juntos, han sido un pilar de apoyo constante. Su esfuerzo por traerme a España, manejando interminables trámites, fue un acto de generosidad y confianza que siempre recordaré. Saber que apostaron por mí, incluso cuando el camino parecía incierto, me dio la fuerza para seguir adelante. Gracias, Loan y Guillermo, por creer en mí y por ser una de las razones por las que hoy puedo celebrar este logro.

También quiero agradecer a mi director Javier Galeano, quien no solo ha sido un mentor en lo profesional, sino también una persona generosa en lo personal. Gracias por permitirme formar parte de tu equipo. Admiro profundamente tu conocimiento y experiencia, y siempre será un placer aprender de alguien tan brillante.

A mis queridas compañeras de trabajo, Raquel González, Marta Sánchez y Clara Gavira, su apoyo y ayuda en el laboratorio ha sido un rayo de luz en este arduo camino. Raquel, gracias a tu ayuda con los trámites y tu constante ánimo fueron fundamentales. Marta y Clara, sus palabras de aliento y su compañía hicieron que los días difíciles fueran más llevaderos. A mis amigas Lucía Lobo, Natalia Hernández y Makarena Rojas, su amistad ha sido un regalo invaluable. Lucía, gracias por estar a mi lado hasta el último momento y apoyarme en todas mis ideas locas y tus hermosos diseños que has creado para este proyecto. Natalia, gracias por tu apoyo incondicional y su enorme corazón. Gracias por estar siempre ahí, por compartir mis alegrías y levantarme en mis caídas. Makarena, hemos compartido tanto desde nuestros días en la universidad, y tu sinceridad y apoyo constante son algo que valoro inmensamente.

Mamá, tu dedicación y tus palabras de aliento fueron la luz que me guio durante esos años cruciales. Papá, tu apoyo constante y tu confianza en mis capacidades fueron el pilar sobre el cual construí este sueño. Si hoy estoy aquí, culminando mi doctorado, es gracias a ustedes, a su amor que me ha sostenido desde el primer día. A mis hermanas, que han sido mis compañeras de vida, mi refugio en los momentos difíciles les agradezco profundamente. Sé que siempre están ahí para mí, brindándome su apoyo y amor incondicional. Y a mis sobrinas y sobrinos, ustedes son la alegría de mi vida, y haría cualquier cosa por verlos felices.

A Nicolás alegría, mi compañero de vida y de sueños. Desde aquellos días en la universidad, cuando nuestros caminos se cruzaron, has sido mi roca, mi motivación y mi fuerza. Contigo he encontrado un apoyo incondicional, no solo en los momentos felices, sino también en los desafíos que la vida y el camino académico nos han presentado. Gracias a ti y por ti, me atreví a cruzar fronteras y venir a España para terminar nuestra carrera universitaria y luego juntos hacer el doctorado. Tus

palabras de aliento y tu confianza en nuestro futuro fueron el empuje que necesitaba para vencer mis miedos y dudas. Desde entonces, has estado a mi lado, incansablemente, ayudándome en cada experimento, en cada obstáculo, en cada paso de este arduo camino hacia el doctorado. No hay palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy por tenerte en mi vida. Has sido mi compañero en el laboratorio, mi consejero, mi crítico y, sobre todo, mi mayor amor. En cada logro, en cada avance, estás tú, porque sin tu apoyo nada de esto hubiera sido posible, esta tesis también te pertenece. Te agradezco por cada día, por cada gesto de cariño, por tu paciencia infinita (realmente infinita) y por siempre pensar en mi bienestar. Eres un ser maravilloso, y me siento profundamente afortunada y orgullosa de caminar a tu lado, tanto en lo profesional como en lo personal. Hoy, con todo lo que hemos vivido juntos, sé que nuestro amor es lo más hermoso que me ha dado la vida. Estoy emocionada por todo lo que nos espera, incluyendo el paso que pronto daremos al casarnos. Gracias por ser mi compañero, mi mejor amigo, mi cómplice y el amor de mi vida. Te amo con todo mi corazón.

Abstract

The present industrial PhD thesis highlights the evaluation of the full utilization of the *Synsepalum dulcificum* plant for food and healthcare applications. The thesis project (IND2019/BIO-17192 Community of Madrid) funded by the company Medicinal Gardens in collaboration with the UPM Center of Biomedical Technology aims to increase productivity, sustainable growth and market competitiveness of those products derived from this plant.

The growing demand for polyphenols with antioxidant capacity in varied sectors, including food, cosmetics, and pharmaceuticals, has driven the search for new sources of these compounds. One large reason is due to these compounds' health benefit, particularly in the prevention of metabolic diseases such as diabetes, malignancies, and cardiovascular issues.

In this context, the bioactivity of *Synsepalum dulcificum* was investigated, already known for its antioxidant capacity and therapeutic potential against colorectal cancer. The impact of this plant on the immune system was also evaluated, along with the demonstration of the food safety of its concentrated extracts. It was found that extracts from pulp with skin (DMB®), seeds, and leaves possess anticancer properties against the DLD-1, HT-29, SW480, and SW620 colorectal cancer cell lines. Additionally, a characterization of its IC₅₀ was performed, and its immunomodulatory properties were described, focusing on T lymphocyte cells (CD3, CD4, and CD8). Using HPLC and GC-MS, possible compounds responsible for such bioactivity were identified, including the first-time description of the presence of protocatechuic acid in DMB®.

Simultaneously, extractions using natural deep eutectic solvents (NaDES) were evaluated as a sustainable and efficient alternative for the extraction of compounds with antioxidant capacity. This innovative methodology was validated in various fruits to ultimately design a method (via artificial intelligence-machine learning) capable of predicting and understanding the relationship between the nutritional properties of different natural extracts and the ability of various

NaDES to extract the maximum amount of antioxidant compounds from these extracts.

The results of this study indicate that NaDES can be effective in extracting phenolic compounds, surpassing the conventional 70% ethanol solvent in most fruits. NaDES 27 stood out for its high yield in extraction. However, predicting the antioxidant capacity of fruits based on their nutritional characteristics was not possible, which led to the use of unsupervised learning as a strategy to explore the relationships between antioxidant capacity and nutritional characteristics. This strategy yielded an interesting result, showing that fruits can be significantly grouped into three clusters based on their glycine and phytosterol content. It was found that the higher the content of these elements in the fruit, the greater the amount of antioxidant compounds extracted using NaDES solvents. Similarly, grouping fruits based on the amount of solvent-extracted antioxidants revealed that NaDES 9, NaDES 16, and 70% ethanol allowed clustering into three statistically significant groups. The cluster with the highest antioxidant capacity was observed to have higher amounts of total proteins, energy (Kcal), zinc, and phosphorus.

The conclusions of this research highlight the potential of *Synsepalum dulcificum* as a source of antioxidants and therapeutic agents, and the efficacy of NaDES as a sustainable option for the extraction of compounds with antioxidant capacity.

Resumen

La presente tesis de doctorado industrial es una puesta en valor del aprovechamiento para aplicaciones alimenticias y sanitarias de la planta *Synsepalum dulcificum* en su totalidad. El proyecto de tesis (IND2019/BIO-17192 Comunidad de Madrid) financiado por la empresa Medicinal Gardens en colaboración con el Centro de Tecnología Biomédica de la UPM tiene como objetivo aumentar la productividad, el crecimiento sostenible y la competitividad en el mercado de los productos derivados de esta planta.

La creciente demanda de polifenoles con capacidad antioxidante en sectores como el alimentario, cosmético y farmacéutico ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de estos compuestos. Una razón importante se debe a los beneficios para la salud de estos compuestos como la diabetes, neoplasias malignas y problemas cardiovasculares.

En este contexto se investigó la bioactividad de *Synsepalum dulcificum*, conocida por su capacidad antioxidante y su potencial terapéutico contra el cáncer colorrectal, evaluando además su impacto en el sistema inmune y demostrando la seguridad alimentaria de sus extractos concentrados. Se encontró que los extractos de pulpa con piel (DMB®), semilla y hoja poseen propiedades anticancerígenas frente a las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW480 y SW620. También se ha realizado una caracterización de su CI₅₀, y la descripción de sus propiedades inmunomoduladoras frente a las células linfocíticas T (CD3, CD4 y CD8). Mediante HPLC y GC-MS se ha logrado identificar posibles compuestos responsables de dicha bioactividad, como por ejemplo la descripción por primera vez de la presencia de ácido protocatecúico en DMB®.

Paralelamente, se evaluaron las extracciones con disolventes naturales eutécticos profundos (NaDES) como alternativa sostenible y eficiente para la extracción de compuestos con capacidad antioxidante. Esta metodología innovadora se validó en diversas frutas con el fin de diseñar un método (por inteligencia artificial-machine learning). Un método capaz de predecir y comprender la relación entre las propiedades nutricionales de distintos extractos naturales y la capacidad que los

distintos NaDES tienen de extraer el máximo de compuestos con poder antioxidante de esos extractos.

Los resultados de este estudio indican que los NaDES pueden ser efectivos en la extracción de compuestos fenólicos superando el disolvente convencional Etanol 70% en la mayoría de las frutas. Destacando por su alto rendimiento en la extracción el NaDES 27. Sin embargo, la predicción de la capacidad antioxidante de las frutas no fue posible utilizando como base sus características nutricionales, por esta razón se utilizó el aprendizaje no supervisado como estrategia para ver las relaciones que puedan existir entre la capacidad antioxidante y características nutricionales. Con esta estrategia se obtuvo un interesante resultado ya que las frutas se pueden agrupar significativamente en tres clústeres en base a su cantidad de Glicina y fitoesterol. Resultando que, a mayor cantidad de estos elementos en la fruta, mayor cantidad de compuestos antioxidantes se extraen con disolventes NaDES. En paralelo, agrupando las frutas en función de la cantidad de antioxidantes obtenidos por los disolventes, encontramos que, los NaDES 9, NaDES 16 y Etanol al 70% permiten la agrupación en tres clústeres con diferencias estadísticamente significativas. Observando que el clúster con mayor capacidad antioxidante posee mayor cantidad de Proteínas totales, Energía (Kcal), Zinc y Fosforo.

Las conclusiones de esta investigación destacan el potencial de *Synsepalum dulcificum* como fuente de antioxidantes y agentes terapéuticos, y la eficacia de los NaDES como una opción sostenible en la extracción de compuestos con capacidad antioxidante.

Tabla de Contenido

1. Introducción	27
1.1. Marco empresarial.....	28
1.1.1. Baía Food y su novel food Dried Miracle Berry (DMB®).....	28
1.1.2. Comercialización del producto DMB®.....	29
1.1.3. Misión.....	30
1.1.4. Estrategias de innovación y desarrollo de productos.....	31
1.2. Problemática e interés de Baía Food: subproductos no aprovechados, polifenoles y medio ambiente.....	31
1.3. Motivación.....	33
2. Antecedentes	34
2.1. <i>Synsepalum dulcificum</i>	34
2.1.1. Historia.....	34
2.1.2. Taxonomía de <i>Synsepalum dulcificum</i>	35
2.1.3. Descripción botánica <i>Synsepalum dulcificum</i>	36
2.1.4. Distribución geográfica actual de <i>Synsepalum dulcificum</i>	38
2.1.5. Propiedades de <i>Synsepalum dulcificum</i>	39
2.2. Metabolitos secundarios: Compuestos fenólicos.....	41
2.2.1. Estructura de los compuestos fenólicos.....	42
2.2.2. Mecanismo de acción y salud humana.	44
2.2.3. Obtención de compuestos fenólicos.....	48
2.3. Modelización de sistemas complejos.....	53
2.3.1. Aprendizaje supervisado.....	53
2.3.2. Aprendizaje no supervisado.....	53
2.3.3. Aprendizaje por refuerzo.....	54
3. Objetivos	55
3.1. Objetivos Específicos.....	55
4. Materiales y métodos	56
4.1. Material vegetal.....	57
4.1.1. <i>Synsepalum dulcificum</i> (DMB®, semilla y hoja).....	57
4.1.2. Frutas de interés comercial.....	58

4.1.3. Infusiones comerciales	59
4.2. Obtención de compuestos fenólicos totales en <i>Synsepalum dulcificum</i>	59
4.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	60
4.3.1. Cuantificación de contenido total de fenoles (CTF)	60
4.3.2. Cuantificación de contenido total de flavonoides totales	61
4.3.3. Determinación de capacidad antioxidante mediante la eliminación de radicales DPPH•	62
4.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC y CG/MS	63
4.4.1. Preparación de los extractos	63
4.4.2. Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	63
4.4.3. Análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	65
4.5. Efecto anticancerígeno en cáncer colorrectal	65
4.5.1. Ensayo de viabilidad celular (CI50)	66
4.5.2. Ensayo de exposición crónica	67
4.5.3. Análisis de biomarcadores tumorales mediante citometría de flujo	68
4.6. Proliferación linfocitaria	70
4.7. Análisis de aglutinación y hemólisis	72
4.8. Disolventes alternativos para la obtención de polifenoles y miraculina	73
4.8.1. Elaboración de disolventes eutécticos profundos (NaDES)	73
4.8.2. Extracción de compuestos fenólicos con NaDES y cuantificación de capacidad antioxidante	75
4.8.3. Obtención y cuantificación de miraculina de DMB®	76
4.9. Modelamiento matemático	77
4.9.1. Base de datos 1: Características nutricionales de las frutas	78
4.9.2. Bases de datos 2: Capacidad antioxidante de compuestos obtenidos mediante NaDES de distintas frutas	78
4.9.3. Algoritmos aprendizaje automático supervisados	80
4.9.4. Algoritmos aprendizaje automático no supervisados	83
4.9.5. Análisis comparativo de clústeres en base a propiedades nutricionales y de clúster en base a capacidad Antioxidante	86
4.10. Análisis estadístico	86
5. Resultados	88
5.1. DMB®: Pulpa de <i>Synsepalum dulcificum</i>	89
5.1.1. Determinación de contenidos fenoles totales (CFT) de DMB®	90
5.1.2. Determinación de flavonoides totales de DMB®	93

5.1.3. Determinación capacidad antioxidante de DMB®.....	94
5.1.4. Comparación de DMB® con otras frutas.....	95
5.1.5. Determinación de fenoles de DMB® mediante HPLC.....	99
5.1.6. Identificación de compuestos de DMB® mediante CG-MS.....	101
5.1.7. Efecto anticancerígeno de DMB®.....	104
5.1.8. Efecto inmunomodulador de DMB®.....	109
5.1.9. Actividad aglutinante del extracto DMB®.....	110
5.2. Semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	112
5.2.1. Obtención y cuantificación antioxidante de los compuestos fenólicos de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	113
5.2.2. Identificación de compuestos de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i> mediante CG-MS.....	114
5.2.3. Efecto anticancerígeno de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	116
5.2.4. Efecto inmunomodulador de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	121
5.2.5. Actividad aglutinante de semilla de <i>S. dulcificum</i>	122
5.3. Hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	124
5.3.1. Obtención y cuantificación antioxidante de los compuestos fenólicos de semilla de <i>S. dulcificum</i>	125
5.3.2. Identificación de compuestos de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i> mediante CG-MS.....	127
5.3.3. Efecto anticancerígeno de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	129
5.3.4. Efecto inmunomodulador de hoja de <i>S. dulcificum</i>	133
5.3.5. Actividad aglutinante de hoja de <i>S. dulcificum</i>	134
5.4. Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES).....	136
5.4.1. Obtención de miraculina de DMB® mediante NaDES.....	137
5.4.2. Obtención de compuestos con capacidad antioxidante de DMB® mediante NaDES.....	139
5.5. Uso de aprendizaje automático para la obtención de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante mediante los disolventes NaDES.....	141
5.5.1. Bases de datos.....	143
5.5.2. Predicción de la capacidad antioxidante de los fenoles obtenidos mediante los NaDES a partir de las características funcionales de las frutas	144
5.5.3. Agrupación (clustering) de frutas.....	145
6. Discusión	167
6.1. Obtención y cuantificación de compuestos fenólicos de <i>Synsepalum dulcificum</i> mediante disolvente convenciones.....	167
6.1.1. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de DMB®.	168

6.1.2. Capacidad antioxidante de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	169
6.1.3. Capacidad antioxidante de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	169
6.2. Identificación de compuestos fenólicos de <i>Synsepalum dulcificum</i>	170
6.2.1. Identificación de compuestos en <i>DMB®</i>	171
6.2.2. Identificación de compuestos de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i> . 173	
6.2.3. Identificación de compuestos de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i> . ..	174
6.3. Actividad biológica de <i>Synsepalum dulcificum</i>	175
6.3.1. Seguridad alimentaria.	175
6.3.2. Dosis- respuesta frente a líneas de cáncer colorrectal.	176
6.3.3. Efecto inmunomodulador	182
6.4. Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES) una alternativa innovadora para la obtención de compuestos fenólicos.	185
6.4.1. Capacidades antioxidantes de <i>DMB®</i> y frutas varias mediante NaDES.	185
6.4.2. Obtención de Miraculina con NaDES.....	186
6.5. Aplicación del uso de los NaDES. Modelamiento de Machine Learning..	187
6.5.1. Agrupación de frutas según las propiedades nutricionales.	188
6.5.2. Agrupación de frutas según su capacidad antioxidante obtenida mediante NaDES.	189
6.5.3. Agrupación de NaDES según su capacidad de extracción de capacidad antioxidante según el tipo de fruta.	192
7. Conclusiones	197
8. Referencias	199
9. Anexos	223

Lista de Figuras

Figura 1 Fotografía de <i>Synsepalum dulcificum</i>	xvii
Figura 2 Baya de <i>Synsepalum dulcificum</i> y sus partes.	37
Figura 3 Distribución geográfica de <i>Synsepalum dulcificum</i> en el mundo.	39
Figura 4 Vías de señalización para la biosíntesis de metabolitos secundarios. .	42
Figura 5 Estructuras de polifenoles.	42
Figura 6 Diferencia estructural de polifenoles flavonoides y no-flavonoides.	43
Figura 7 Clasificación de los polifenoles en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides.	45
Figura 8 Clasificación de disolventes y grupos funcionales según su polaridad.	49
Figura 9 Esquema general de la metodología empleada en el estudio.	56
Figura 10 Separación celular de sangre periférica mediante gradiente de Ficoll.	71
Figura 11 Evolución visual de la preparación del NaDES bajo aplicación de temperatura.	74
Figura 12 Base de datos 1: Propiedades nutricionales de frutas.	78
Figura 13 Base de datos 2. Propiedad antioxidante de distintas frutas obtenida mediante los disolventes naturales eutécticos profundos.	79
Figura 14 Interfaz del software Orange3.	79
Figura 15 Representación de clasificación o regresión mediante una Máquina de Vectores de Soporte (SVM).	81
Figura 16 Representación de un diagrama de árbol de decisión, para predecir la clase del conjunto de datos dado.	82
Figura 17 Representación del algoritmo de aprendizaje automático Árbol aleatorio (Random Forest).	83
Figura 18 Representación del algoritmo de agrupamiento K-medias.	84
Figura 19 Representación de un dendrograma.	85

Figura 20 Efecto de la concentración de etanol sobre el contenido de fenoles totales en DMB®.....	91
Figura 21 Efecto de la concentración de etanol, tiempo de extracción y ratio muestra-disolvente en la obtención de compuestos fenólicos de DMB®.	92
Figura 22 Efecto de la concentración de etanol sobre el contenido de flavonoides totales en DMB®.....	93
Figura 23 Efecto de la concentración de etanol sobre la capacidad antioxidante de DMB® con el ensayo DPPH.....	94
Figura 24 Efecto de la concentración de etanol, tiempo y relación muestra-disolvente sobre la capacidad antioxidante de DMB®.....	95
Figura 25 Comparación de los fenoles totales de diferentes frutas con respecto a DMB®.	96
Figura 26 Comparación de los flavonoides totales de diferentes frutas con respecto a DMB®.....	97
Figura 27 Comparación del porcentaje de inhibición al radical DPPH de diferentes frutas con respecto a DMB®.....	98
Figura 28 Estructura química y el comportamiento de los compuestos identificados mediante HPLC en extracto DMB®.	100
Figura 29 Valores CI50 de líneas celulares de cáncer colorrectal frente a extracto acuoso proveniente de DMB®.	104
Figura 30 Viabilidad celular de líneas celulares de cáncer colorrectal frente oxaliplatino y DMB®.....	106
Figura 31 Curva de crecimiento de la línea celular SW620 en presencia de extracto de DMB®.....	108
Figura 32 Dosis-respuestas a oxaliplatino de línea metastásica SW620 tratadas con extracto acuoso de DMB® de manera crónica.	108
Figura 33 Expresión de biomarcadores linfocitario tras exposición DMB®.	110
Figura 34 Representación del grado de hemaglutinación del extracto acuoso de DMB®.....	111
Figura 35 Efecto de disolvente sobre la capacidad antioxidante de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	113

Figura 36 Valores CI50 de líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con extracto semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	116
Figura 37 Curva de crecimiento de la línea celular SW620 en presencia de extracto de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	117
Figura 38 Dosis-respuestas a oxaliplatino de línea metastásica SW620 tratadas con extracto de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i> ..	118
Figura 39 Expresión de biomarcadores tumorales en línea celular de cáncer colorrectal (SW620) bajo exposición constante a extracto de semilla con concentración fija (0,0133 mg/mL)..	120
Figura 40 Expresión de biomarcadores linfocitario tras exposición semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	121
Figura 41 Representación del grado de hemaglutinación de semilla de <i>Synsepalum dulcificum</i>	123
Figura 42 Efecto de disolventes sobre el porcentaje de inhibición al radical DPPH de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i> mediante.....	126
Figura 43 Capacidad antioxidante de diferentes tes e infusiones mediante las técnicas DPPH.....	127
Figura 44 Valores CI50 de líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con extracto etanólico de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	130
Figura 45 Curva de crecimiento de la línea celular SW620 en presencia de extracto de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	131
Figura 46 Expresión de biomarcadores tumorales en línea celular de cáncer colorrectal (SW620) bajo exposición constante a extracto de hoja con concentración fija (0,0072 mg/mL)..	132
Figura 47 Expresión de biomarcadores linfocitario tras exposición hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	133
Figura 48 Representación del grado de hemaglutinación de hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	135
Figura 49 Detección de miraculina en extracto de DMB® obtenidos con disolventes naturales eutécticos profundos (NaDES)..	138
Figura 50: Rendimiento de extracción de la proteína miraculina mediante Disolventes naturales eutécticos profundos.....	139

Figura 51 Efecto de los disolventes naturales eutécticos profundos sobre la capacidad antioxidante de DMB®.....	140
Figura 52 Resumen de análisis de clústeres de dos bases de datos: propiedades nutricionales y capacidad antioxidante.	142
Figura 53 Bases de datos utilizados en el estudio.....	143
Figura 54 Algoritmos de aprendizaje supervisado utilizados mediante el programa Orange3.	144
Figura 55 Distribución de los distintos grupos de frutas en función de sus propiedades nutricionales mediante el algoritmo K-medias.....	147
Figura 56 Agrupación jerárquica de las frutas en función de sus propiedades nutricional..	148
Figura 57 Distribución de las frutas según la cantidad de fitoesteroles y glicina utilizando el diagrama de caja y bigotes (Boxplot)..	150
Figura 58 Gráfico de dispersión de las frutas según la cantidad de fitoesteroles y glicina.	151
Figura 59 Capacidad antioxidante de diferentes frutas agrupadas según su composición de Glicina y Fitoesteroles.	152
Figura 60 Distribución de los distintos grupos de frutas en función de su porcentaje de inhibición al radical DPPH mediante el algoritmo K-medias.....	153
Figura 61 Agrupación jerárquica de las frutas en función de su porcentaje de inhibición al radical DPPH de los compuestos obtenidos mediante NaDES.....	154
Figura 62 Distribución de las frutas según el porcentaje de inhibición al radical DPPH obtenida mediante NaDES 9 y NaDES 16.	156
Figura 63 Gráfico de dispersión de las frutas según la capacidad antioxidante obtenida mediante NaDES-9 y NaDES-16.	157
Figura 64 Contenido nutricional de diferentes frutas agrupadas según su capacidad de inhibición al radical DPPH con los disolventes NaDES.....	158
Figura 65 Agrupación jerárquica de las frutas en función de su % de inhibición al radical DPPH obtenida con el disolvente Etanol al 70%.....	159
Figura 66 Distribución de las frutas según su % de inhibición al radical DPPH obtenida mediante Etanol al 70%.....	160

Figura 67 Matriz de calor que muestra el porcentaje de inhibición al radical DPPH diversas frutas utilizando diferentes disolventes NaDES y etanol al 70..	163
Figura 68 Agrupación jerárquica de los NaDES y etanol al 70% con respecto al % de inhibición al radical DPPH de las frutas arándano y guaraná.	165
Figura 69 Distribución de las NaDES con respecto al % de inhibición al radical DPPH de las frutas arándano y guaraná.	166
Figura 70 Esquema resumen del proceso de toma de decisiones obtenido mediante aprendizaje no supervisado.....	194

Lista de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Synsepalum dulcificum</i> (información obtenida de Royal Botanic Gardens Kew).....	36
Tabla 2 Sinónimos de <i>Synsepalum dulcificum</i> (información obtenida de Royal Botanic Gardens Kew)	36
Tabla 3 Disolventes convencionales utilizados para la extracción de compuestos polifenólicos.	50
Tabla 4 Información de anticuerpos para la detección de marcadores tumorales utilizados en este estudio.....	69
Tabla 5 Información de anticuerpos para la detección de células linfocitarias utilizados en este estudio.....	72
Tabla 6 Concentración de extractos utilizados para el ensayo de hemaglutinación y hemólisis.	73
Tabla 7 Composición de disolventes naturales eutécticos profundos usados en el presente estudio.	74
Tabla 8 Perfil fenólico identificado en extractos de DMB® mediante HPLC....	101
Tabla 9 Compuestos identificados en extracto acuoso de DMB® mediante GC-MS.	103
Tabla 10 CI50 en µg/mL de oxaliplatino y oxaliplatino con DMB® en líneas celulares de cáncer colorrectal DLD-1, HT-29, SW480 y SW620.....	105
Tabla 11 Compuestos identificados en extracto etanólico de semilla de <i>S. dulcificum</i> mediante GC-MS	115
Tabla 12 Compuestos identificados en extracto etanólico (40%) de hoja de <i>S. dulcificum</i> mediante GC-MS	129
Tabla 13 Evaluación de los modelos supervisados utilizados en este estudio. .	145
Tabla 14 Valores de K-medias de frutas en función de sus propiedades nutricionales.....	147
Tabla 15 Valores de K-medias de las frutas en función de su capacidad antioxidante obtenida mediante disolventes eutécticos profundos	153
Tabla 16 Porcentaje de inhibición al radical DPPH de diversas frutas utilizando etanol al 70% y NaDES como disolventes.....	162

Tabla 17 Compuestos identificados en DMB® mediante HPLC y sus propiedades.	172
----------------------------------------------------------------------------------	-----

Abreviaturas y Acrónimos

μg	Microgramo
μL	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
ARN	Ácido Ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
CF	Contenido de Flavonoides Totales
CFT	Contenidos de Fenoles Totales
CI50	Concentración Inhibidora media máxima
CRISPR-Cas9	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas asociada a la proteína 9
DG SANTE	Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria
DMB®	Dry Miracle Berry
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMS	Duncan's Multiple Range Test
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ERO	Especie Reactiva de Oxígeno
FADH ₂	Forma reducida de la flavina adenina dinucleótido
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
g	Medida de aceleración
g	Gramos
GAE	Equivalente a Ácido Gálico
GC/MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
GIZ	Alemana de Cooperación Internacional para el Desarrollo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
IA	Inteligencia artificial
kDa	Kilodalton
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NaDES	Disolventes Naturales Eutécticos Profundos
NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina
NF	Novel Food
Pa	Pascal
PBS	Tampón fosfato salino

PS	Peso seco
p/v	Relación peso: volumen
QE	Equivalente a Quercetina
RAGE	Receptor para productos finales de glicación avanzada
RE	Reglamento de ejecución
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT	Tiempo de retención
<i>S. dulcificum</i>	<i>Synsepalum dulcificum</i>
siRNA	ARN pequeño de interferencia
UE	Unión europea
UPM	Universidad Politécnica de Madrid

1. Introducción

El desarrollo de esta tesis con mención industrial parte de una necesidad real de la empresa Medicinal Gardens SL (en adelante Baïa Food): maximizar el valor de la planta *Synsepalum dulcificum* (*S. dulcificum*) en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Actualmente, la empresa explota la proteína miraculina de la baya mediante el producto comercial Dried Miracle Berry (DMB®) aprovechando su propiedad única de alterar la percepción del sabor. Lograr la comercialización de DMB®, en su gran parte fue gracias a las ayudas concedidas por la Comunidad de Madrid, que permitieron estudiar el producto mediante la realización de doctorados industriales. En un principio, estos proyectos en base a la producción de DMB® se centraron en la principal característica de la baya (el cambio de percepción del sabor de los alimentos ácidos). No obstante, tras finalizar el proyecto, surgió un interés creciente para explorar la propiedad antioxidante de la baya y los subproductos derivados de su procesamiento, hojas y semillas. Posicionando esta tesis doctoral en la continuidad del proyecto sobre el aprovechamiento total de *S. dulcificum*.

Con el propósito de ofrecer una visión integral del contexto empresarial, se comienza con una descripción general de la empresa, su misión y estrategias de comercialización, seguida de sus problemáticas. Este enfoque tiene como finalidad enmarcar y delimitar el alcance del trabajo realizado. En esta sección no se busca realizar una revisión exhaustiva de las teorías de referencia, ni formular una teoría unificada de las distintas perspectivas. Más bien, se busca aportar elementos que contribuyan al objetivo planteado, “*Maximizar el valor de los recursos naturales investigados y desarrollados por la empresa*”.

1.1. Marco empresarial

1.1.1. Baia Food y su novel food Dried Miracle Berry (DMB®)

Medicinal Gardens S.L. (Registro Sanitario N°40.058621/M), conocida comercialmente como Baia® (www.baiafood.com), es una empresa dedicada a desarrollar y comercializar ingredientes nutracéuticos, alimentos funcionales y complementos alimenticios con efectos beneficiosos para la salud, con un claro enfoque en mejorar la calidad de vida de las personas de una forma fácil y deliciosa.

La empresa fue fundada en 2013 por Loan Bensadon, licenciado en Farmacia, y Guillermo Milans del Bosch, doble licenciado en Administración y Dirección de Empresas y Derecho. Esto ocurrió tras explorar el enorme potencial de un Novel Food (NF) actualmente comercializado en la UE: Dried Miracle Berry (DMB®). Novel Food según la Union Europea, *“Se entiende por nuevo alimento aquel que no había sido consumido en un grado significativo por los seres humanos en la UE antes del 15 de mayo de 1997”* (European commission, 2024).

DMB® consiste en la pulpa y piel liofilizada de la baya de la planta *S. dulcificum*, conocida como baya milagrosa, endémica del Oeste de África. La baya milagrosa es capaz de transformar temporalmente y de forma natural el sabor ácido en dulce. Tras un análisis de la regulación europea (Reglamento UE 2015/2283), la empresa tomó estrategias para la realización de un dossier, incorporando un equipo para el diseño y coordinación de los estudios de seguridad.

Convencidos en el árwa de la salud (principalmente diabetes, disgeusia y obesidad) y gastronómico de esta fruta, los socios decidieron apostar e invertir en este proyecto de emprendimiento. Para ello, se realizaron viajes a Ghana con el fin de visitar las plantaciones, conocer a los proveedores y afianzar las relaciones con el GIZ (Sociedad Alemana de Cooperación Internacional) para optaron por la contratación de un técnico agrícola local, sentando así las bases de una cadena de suministro ética, sostenible y respetuosa con los estándares europeos de calidad y seguridad alimentaria. Tras expresar su intención de respetar el Protocolo de Nagoya, la empresa obtuvo el apoyo del Ministerio de Agricultura de Ghana, entrando en el programa MOAP. En este punto, los socios desarrollaron un plan

empresarial estratégico para conseguir la financiación semilla necesaria, e iniciar el proyecto. Para el año 2015, inversores privados se interesaron en las aplicaciones sociosanitarias de esta planta (con mercado potencial de 207.469 millones de euros), por lo que entraron en el accionariado de la empresa. Gracias a esto, la empresa pudo dedicarse a la investigación y su desarrollo durante ocho años. En el año 2021, consiguió la aprobación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) bajo el Reglamento (UE) 2015/2283. Lo cual dicta que *“DMB® es seguro para el consumo humano y ha concedido la exclusividad de comercialización a Baïa® durante cinco años”*. En este sentido, existen restricciones para grupos poblacionales como mujeres embarazadas y lactantes, y niños. La cantidad máxima diaria permitida es de 0,7g/persona/día del ingrediente *“frutos desecados de *S. dulcificum*”*.

Este nuevo producto es empleado en nutrición clínica, especialmente para solventar problemas derivados de la disgeusia (alteraciones o pérdidas del gusto) en pacientes oncológicos. En este tipo de pacientes, los efectos secundarios provenientes de la radio o quimioterapia les hace percibir la comida con sabores metálicos o desagradables. Además, se ha estado investigando si este producto puede ayudar a la percepción del sabor en pacientes que han padecido Covid-19 y aun sufren problemas relacionados con el gusto.

1.1.2. Comercialización del producto DMB®

La introducción de nuevas plantas exóticas en Europa está sujeta a diferentes normativas que incluyen la necesidad de certificados y controles obligatorios. Por un lado, la EFSA es la principal entidad responsable de la evaluación científica de los nuevos alimentos en Europa. Mientras que la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria (DG SANTE), se encarga de la regulación y toma de decisiones sobre la autorización de los nuevos alimentos en el mercado europeo. Basándose en la evaluación de EFSA y DG SANTE, se decide si un nuevo alimento puede ser autorizado en la UE. A nivel de España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), que depende del Ministerio de Consumo, se encarga de la implementación y vigilancia de la normativa europea

en el país. AESAN en coordinación con EFSA también participa en el proceso de autorización de nuevos alimentos cuando es necesario (European Commission; Aesan, 2024; EFSA, 2024).

La EFSA ha concedido el aval científico ante el consumo del producto DMB®, destacando su seguridad para el consumo humano gracias a estudios realizados por la empresa Medicinal Gardens SL (Baïa Food) (Turck et al., 2021). En Europa, esta fruta se acoge al reglamento como exótico bajo la regulación de la UE 2015/2283 (Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, 2015). Su comercialización se encuentra autorizada bajo el Reglamento de Ejecución (RE) 2021/1974 de la Comisión de 12 de noviembre de 2021. Se incluye en la lista como nuevos alimentos autorizados establecida 2017/2470, siendo Medicinal Gardens SL, la empresa autorizada legalmente a comercializar el nuevo alimento (BOE.es, 2021).

Actualmente, la empresa se encuentra en proceso activo para lograr comercializar el producto DMB® fuera de la UE, siendo su principal objetivo Reino Unido (UK). Esta solicitud se encuentra bajo evaluación de riesgos por la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido (FSA), responsable de la salud pública en UK. A su vez, la empresa se encuentra gestionando la optimización de suministro bajo la normativa aduanera y barrera comercial británica.

1.1.3. Misión

La misión de Baïa Food es mejorar la calidad de vida de las personas a través de la nutrición, desarrollando alimentos funcionales y suplementos nutricionales con efectos beneficiosos para la salud. Para ello, utiliza ingredientes naturales y explota sus propiedades beneficiosas, manteniendo siempre el respeto por el medio ambiente y la ética empresarial. Gracias a ello, la empresa ha recibido la Certificación B Corp (2022), que la acredita como una compañía que construye una economía más inclusiva y sostenible para la sociedad y el planeta.

Además de la certificación B Corp, Baïa Food ha recibido varios premios y reconocimientos a lo largo de los años, reflejando su enfoque innovador y sostenible en la industria alimentaria. Entre ellos se encuentra el Premio PYME Innovadora

(2021), Otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España; el Premio Ingenia de la Plataforma Food for Life (2021); el Premio a la “Startup” más Innovadora en el Summit Foodtech Ftalks (2021); y el Reconocimiento en la aceleradora Lanzadera (2022).

1.1.4. Estrategias de innovación y desarrollo de productos

Desde sus primeros pasos, Baïa Food ha destinado gran parte de sus recursos al departamento de I+D. Su estrategia se ha basado en la investigación y el desarrollo continuo, especialmente en torno a aplicaciones de la proteína miraculina.

Además de su enfoque en la innovación de productos, Baïa Food ha puesto un gran énfasis en la sostenibilidad y el comercio justo. La empresa colabora directamente con comunidades locales en África, asegurando que sus productos no solo sean de alta calidad, sino que también generen beneficios económicos en las regiones de origen. Este compromiso incluye la instalación de plantas de procesamiento locales (en Ghana) para procesar el producto garantizando su calidad mientras se minimiza su huella ambiental.

A lo largo de su trayectoria, Baïa Food ha diversificado su línea de productos. Inicialmente se centró en superalimentos tradicionales, como son el açaï, cacao, té matcha y el baobab. Más recientemente se enfoca en la nutrición personalizada y la creación de suplementos que abordan problemas de salud específicos, como el estrés, sueño, inmunidad, pérdida de peso, cuidado personal, salud mental y digestiva. Esta evolución ha sido clave para su crecimiento como industria y expansión en el mercado español.

1.2. Problemática e interés de Baïa Food: subproductos no aprovechados, polifenoles y medio ambiente

Baïa Food ha logrado un avance significativo en la comercialización de *S. dulcificum*, debido a miraculina. Sin embargo, este éxito también ha revelado una serie de desafíos empresariales relacionados con la sostenibilidad y el aprovechamiento integral de la planta.

La producción de *S. dulcificum* es costosa, en gran parte debido a la baja eficiencia en el aprovechamiento completo de la baya. Actualmente, solo se utiliza la pulpa de la fruta, la cual representa el 50-60% del peso total de la baya, constituyendo la mayor parte del rendimiento aprovechable. El resto no aprovechado corresponde a una cantidad significativa de subproductos, como las hojas y semillas. Las semillas, por su tamaño relativamente grande en comparación con la pulpa, corresponden a un 20-30% del peso total del fruto. Por otro lado, las hojas, que no están directamente relacionadas con la fruta pero que pueden obtenerse por arrastre durante todo el ciclo de crecimiento, representan el 10-20% del total de la biomasa cosechada.

Actualmente existe un interés creciente en los compuestos antioxidantes. Estos son capaces de entregarle un potencial alto para desarrollar nuevos productos de salud y bienestar. Por lo cual, la investigación de las propiedades de los polifenoles presentes en la baya, hojas y semillas de *S. dulcificum* representa una oportunidad para Baïa Food. Esta línea de investigación no solo podría reducir los costos asociados con el desperdicio de estos subproductos, sino que también podría abrir nuevas vías de comercialización, ampliando la gama de productos de la empresa.

Por otro lado, uno de los desafíos fundamentales que enfrenta Baïa Food en la explotación de *S. dulcificum* es garantizar que todos los procesos de producción y comercialización sean justos, ecológicos y sostenibles. La empresa ha adoptado un enfoque riguroso en este sentido, buscando minimizar el impacto ambiental en todas las etapas de la cadena de valor, desde el cultivo hasta la distribución de sus productos.

El compromiso con la sostenibilidad implica el uso responsable de los recursos naturales en el cultivo de *S. dulcificum*, y la implementación de prácticas agrícolas que respeten el entorno natural de las regiones donde se cultiva esta planta, principalmente África Occidental. Esto incluye el uso de métodos de cultivo orgánico, la reducción de residuos y el apoyo a las comunidades locales mediante prácticas de comercio justo.

La empresa busca desarrollar tecnologías y métodos que permitan un aprovechamiento completo de la planta sin generar residuos contaminantes. De este modo, garantizar que cada paso del proceso de producción sea lo más ecológico posible. Por lo tanto, es esencial la búsqueda de soluciones innovadoras que alineen el crecimiento empresarial con la responsabilidad ambiental y reducción de la huella de carbono.

Este enfoque sostenible no es solo para cumplir con las regulaciones internacionales. También busca satisfacer la creciente demanda de los consumidores por productos que sean tanto saludables como respetuosos con el planeta.

1.3. Motivación

El compromiso de Baía Food con la innovación y la sostenibilidad ha sido el motor para explorar nuevas formas de aprovechar las propiedades de *S. dulcificum*. Esta planta, presenta un gran potencial para contribuir a la salud humana por su contenido de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, lo cual, puede ser aplicado en los sectores alimentario, cosmético y farmacéutico. Además, la extracción eficiente y sostenible de estos compuestos sigue siendo un desafío que demanda soluciones innovadoras.

Caracterizar los compuestos fenólicos y evaluar sus propiedades bioactivas, como los efectos anticancerígenos e inmunoestimulantes ayudará a comprender mejor la potencialidad de *S. dulcificum*. Al mismo tiempo, explorar los Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES) como una alternativa ecológica en la obtención de los compuestos fenólicos representa un paso hacia procesos industriales más respetuosos con el medio ambiente.

Este trabajo no solo busca enfrentar los desafíos técnicos, sino también promover un cambio positivo en cómo se desarrollan y utilizan los recursos naturales en la industria, reafirmando mi compromiso con la ciencia aplicada y la sostenibilidad.

2. Antecedentes

2.1. *Synsepalum dulcificum*

2.1.1. Historia

S. dulcificum (Schumach. & Thonn.) Daniell, es un arbusto tropical perteneciente a la familia Sapotaceae, nativa de África occidental. Los frutos que posee esta planta, conocidos como "fruta o baya milagrosa", han llamado la atención por su propiedad de modificar el sentido del gusto humano. Esto se debe a una glicoproteína denominada miraculina, que transforma los sabores ácidos en dulces al interactuar con las papilas gustativas (Lim et al., 2013). Además, aunque la mayoría de los estudios se han centrado en humanos, la proteína miraculina también ha sido probada en animales, mostrando efectos variados según la especie. Por ejemplo, en primates, como los chimpancés y macacos rhesus, conejos y perros se ha observado un efecto similar al de los humanos. Por otro lado, en roedores no se han detectado cambios significativos en la percepción del sabor (Brouwer et al., 1983; Danilova & Hellekant, 2006; Hellekant, 1976).

Los nativos de África han empleado, consumido y comercializado este fruto desde antes del siglo XVIII (Lim et al., 2013). Sin embargo, Müller, un eclesiástico danés, documentó su uso por primera vez en el año 1662 en los bosques tropicales de la región Fetu en Ghana. Loyer en 1701 en la región de Assinie-Mafia también referenció esta planta en sus escritos. No obstante, las investigaciones se iniciaron en el año 1725 por el cartógrafo francés Chevalier des Marchais. En una incursión por la costa africana, Chevalier observó que los nativos consumían esta baya antes de cada comida, permitiéndoles ingerir alimentos ácidos y agrios elaborados a base de palma agria. Es así como Chevalier vio a este fruto como una potencial herramienta, útil para que los esclavos consumieran frutas cítricas, agua estancada y alimentos en mal estado durante largos viajes. Sin embargo, a pesar de los intentos de Chevalier y, otros exploradores por introducir la planta en Europa, las condiciones de cultivo tropicales no favorecieron su desarrollo (Lim et al., 2013).

En 1827, periodo en que los naturalistas europeos estaban activamente catalogando y clasificando plantas de todo el mundo, se logra clasificar esta variedad. El alemán Schumacher y el danés Thonning nombraron por primera vez la planta como “*Bumelia dulcifica* C.F. Schumacher & P. Thonning”, basándose en las características que refleja la planta. El género *Bumelia*, que es parte de la familia de las Sapotaceae, grupo de plantas conocido por sus frutos comestibles, y el término *dulcifica* proviene del latín *dulcificare*, que significa "volver dulce". El botánico William Freeman Daniell en 1852 cambió el nombre *S. dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell, nombre que se mantiene hasta hoy (Bell, 2004). Este cambio demuestra el progreso en la comprensión de las relaciones entre las especies. Daniell, propuso este cambio basándose en la morfología de la planta y de su comparación con otras especies similares, lo que podría haber incluido diferencias en las estructuras de flores, frutos, hojas o patrones de crecimiento que no eran evidentes para Schumacher y Thonning en su clasificación inicial (Labat and Des Marchais, 1730).

2.1.2. Taxonomía de *Synsepalum dulcificum*

El nombre de S. dulcificum hace referencia a los sépalos de la flor y la capacidad del fruto de convertir los sabores ácidos y amargos en dulces. Esta planta pertenece a la familia Sapotaceae, que incluye alrededor de 1200–1300 especies de árboles y arbustos en regiones tropicales, la mayoría de los cuales producen frutas comestibles. En las especies como *Synsepalum emarginatum* (Nigeria), *S. microcarpum* (Camerún) y *S. cerasiferum* (Gabón), también se ha encontrado la proteína miraculina (Tchokponhoué et al., 2019).

Daniell describió el género *Synsepalum* en el año 1852 y lo publicó en la revista *Pharmaceutical Journal and Transactions*. La clasificación taxonómica del género aparece en la **Tabla 1**, con 177 especies bajo el nombre *Synsepalum*, de las cuales solo 37, incluyendo *Synsepalum dulcificum*, son aceptadas. Además, existen varios sinónimos acuñados por diversos científicos a lo largo de los años (**Tabla 2**).

Tabla 1 | Clasificación taxonómica de *Synsepalum dulcificum* (información obtenida de Royal Botanic Gardens Kew)

Rango	Nombre científico
Reino	Plantae-Plantas
Subreino	Traqueobionta
Subdivisión	Espermatofita
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Ebenales
Familia	<i>Sapotaceae</i> Juss.
Género	<i>Synsepalum</i> (A. DC.) Daniell
Especie	<i>Synsepalum dulcificum</i> (Schumach. & Thonn.) Daniell

Tabla 2 | Sinónimos de *Synsepalum dulcificum* (información obtenida de Royal Botanic Gardens Kew)

Año	Sinónimo	Taxónomo botánico
1827	<i>Bumelia dulcifica</i>	Schumach. & Thonn.
1844	<i>Sideroxylon dulcificum</i>	Alphonse de Candolle (A.DC.)
1912	<i>Bakeriella dulcifica</i>	Marcel Marie Maurice Dubard
1917	<i>Synsepalum glycydora</i>	Herbert Fuller Wernham
1942	<i>Pouteria dulcifica</i>	Charles Baehni
1965	<i>Richardella dulcifica</i>	Charles Baehni

2.1.3. Descripción botánica *Synsepalum dulcificum*

S. dulcificum, puede alcanzar una altura de 3 a 6 metros y tarda hasta 4 años en madurar. El arbusto presenta un crecimiento lento, lineal y ramificado. Las hojas, lanceoladas y puntiagudas en el ápice, se estrechan hacia la base, midiendo 5-15 cm. de largo y 1-4 cm. de ancho, con ocho pares de venas laterales y un color verde oscuro brillante con textura coriácea. Produce flores bisexuales y pequeñas, solitarias o en pequeños grupos de 2-5 racimos o panículas axilares delgadas, de color blanco a amarillo tenue (Achigan-Dako et al., 2015) (Figura 1)



Figura 1 | Fotografía de *Synsepalum dulcificum*. Se aprecian las hojas, las flores y bayas maduras (fotografía cedida por Loan Bensadon perteneciente al trabajo de (Menéndez Rey, 2021)

Los frutos, que genera son redondos a elipsoidales de 2-3 cm. de largo por 1 cm de ancho, tienen una piel que representa aproximadamente el 23% de su estructura total y una pulpa que constituye el 35%. El 42% restante del fruto pertenece a su semilla, que mide entre 1 y 1.5 cm de longitud y tiene una textura lisa y brillante. Generalmente, el color externo de la semilla es marrón oscuro (tegumento), mientras que el interior es blanco (cotiledones) (**Figura 2**). Esta baya, cambia de color, pasando de verde cuando están inmaduros a rojo brillante oscuro o morado intenso al madurar (Sadhana et al., 2020).

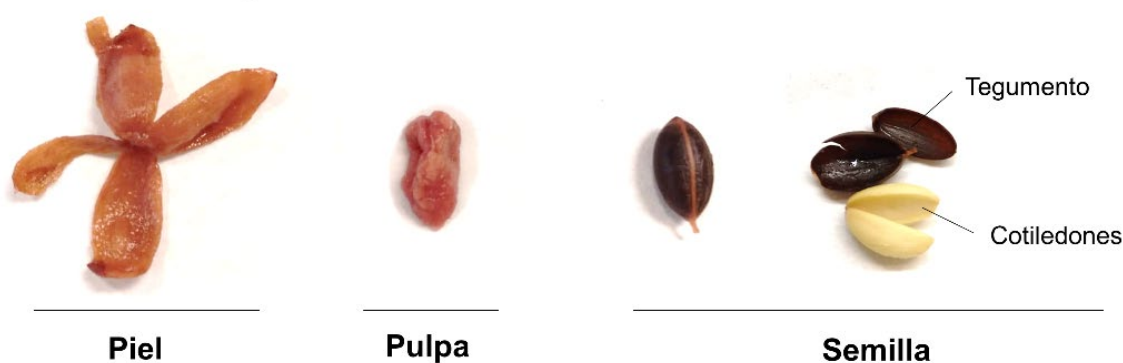


Figura 2 | Baya de *Synsepalum dulcificum* y sus partes. La figura muestra la piel, la pulpa, la semilla que conforman a la baya de *S. dulcificum* (Imagen obtenida de la tesis doctoral de (Menéndez Rey, 2021).

S. dulcificum crece en bosques tropicales donde la humedad del suelo como la del aire son elevadas. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 20°C - 30°C y temperaturas inferiores a 10°C puede perjudicar su desarrollo. La tierra con un pH ligeramente ácido a neutro (6-7), buena capacidad de drenaje y rica cantidad de materia orgánica. La exposición a la luz debe ser indirecta o parcial, adecuada para su adaptación a áreas sombradas. Comúnmente, esta planta se encuentra en altitudes relativamente bajas, por debajo de los 1000 metros sobre el nivel del mar (Tchokponhoué et al., 2023).

2.1.4. Distribución geográfica actual de *Synsepalum dulcificum*.

Actualmente existen plantaciones de *S. dulcificum* en varias regiones del continente africano. Esta planta, crece de forma natural en bosques tropicales y selvas húmedas, principalmente en Nigeria, Camerún, Gabón, Sierra Leona, Guinea, Liberia, República del Congo, Ghana, Benín y Costa de Marfil, siendo estos tres últimos los mayores productores. Sin embargo, se han registrado bajo licencia plantas domesticadas en diferentes países (**Figura 3**) (Information Facility Global Biodiversity, 2023)

Actualmente la explotación y cultivo de esta especie se basa principalmente en patios traseros, granjas de los agricultores y huertos familiares (Tchokponhoué et al., 2021). Sin embargo, su demanda va en aumento por sus propiedades medicinales tanto en fruto como en hoja, semilla y raíces (definida más adelante) (Wilken and Satiroff, 2012; Gorin et al., 2018; Menéndez-Rey et al., 2021).

La necesidad de aumentar los cultivos e introducir esta planta a nivel mundial ha llevado a distintas investigaciones a enfocarse en la adaptación de esta planta ante diferentes medios. Por ejemplo, el uso de aserrín, compost y una combinación de nitrógeno, fósforo y potasio, junto con un suministro controlado de sombra, puede mejorar la producción en vivero. Además, la polinización por insectos influye significativamente en el cultivo (Xingway et al., 2016; Tchokponhoué et al., 2017, 2018, 2019).



Figura 3 | Distribución geográfica de *Synsepalum dulcificum* en el mundo. Mapa donde se muestra la actual distribución de registros de presencia de la planta *S. dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell. En color rojo se encuentran cultivos silvestres. En color rosa, representan plantas domesticadas registradas oficialmente. Imagen obtenida a partir de Global Biodiversity Information Facility (GBIF).

2.1.5. Propiedades de *Synsepalum dulcificum*

En la región de África occidental, la planta *S. dulcificum* juega un papel importante en la medicina tradicional, donde se le atribuyen diversas propiedades curativas. Los pobladores locales aprovechan distintas partes de la planta, ya sea en polvo, té, fresco entre otros. Las hojas frescas se emplean para manejar condiciones como la diabetes, la malaria, la fiebre y los problemas de incontinencia; las semillas se utilizan para aliviar molestias estomacales, combatir la anemia y ayudar en la pérdida de peso; las raíces se destinan al tratamiento de la tos y la tuberculosis; y la corteza se aplica en casos de problemas prostáticos (Fandohan et al., 2017).

Los usos medicinales tradicionales de *S. dulcificum* han impulsado investigaciones científicas, donde han demostrado diversas aplicaciones terapéuticas. En primer lugar, se ha comprobado que los extractos de la planta mejoran la resistencia a la

insulina en modelos animales como ratas, y reducen los niveles de glucosa en sangre, efectos asociados a la diabetes tipo 2 (Chen et al., 2006; Sco et al., 2015; Dioso et al., 2016; Obafemi et al., 2017, 2019). Además, se ha demostrado que la planta inhibe enzimas clave en la digestión de carbohidratos, lo que refuerza su eficacia en el manejo de esta enfermedad crónica.

El potencial de *S. dulcificum* para mejorar la experiencia alimentaria de pacientes sometidos a tratamientos médicos que alteran el sentido del gusto, como la quimioterapia en pacientes con cáncer, se encuentra bajo estudio. En este sentido, la empresa Baía Food ha realizado un estudio clínico triple ciego, aleatorizado y controlado por placebo en el Hospital Universitario La Paz, del cual se ha publicado el protocolo (López-Plaza et al., 2023) los resultados durante 2024 (López-Plaza et al., 2024).

Por otro lado, se han identificado propiedades antihiperuricémicas, reduciendo los niveles elevados de ácido úrico y la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa en macrófagos. Este efecto reductor tiene como potencial en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el exceso de ácido úrico, como la gota. Asimismo, también se ha observado que es capaz de reducir los niveles elevados del colesterol, ampliando aún más su espectro de aplicaciones terapéuticas (Shi et al., 2016; Huang et al., 2020). Además, ha mostrado propiedades anticonvulsivas, lo que sugiere un posible uso en el tratamiento de trastornos neurológicos (Shi et al., 2016).

Estudios con relación al efecto contra el cáncer, incluyendo los más recientes de (Wagner et al., 2023), muestran que los extractos no solo inhiben células de melanoma, sino que también ejercen un impacto citotóxico sobre diversas líneas celulares de cáncer colorrectal. Esta acción no solo reduce la viabilidad de las células cancerosas, sino que además promueve la expresión de genes que inducen la apoptosis (Wang et al., 2011; Wagner et al., 2023)

Esta bioactividad observada en *S. dulcificum* se debe en su mayoría a los metabolitos secundarios. Estos metabolitos poseen capacidad antioxidante, neutralizando los radicales libres, protegiendo las células y tejidos del daño oxidativo, como por ejemplo los compuestos fenólicos.

2.2. Metabolitos secundarios: Compuestos fenólicos

Los metabolitos secundarios que se encuentran de forma natural en las plantas, desempeñando un papel en la defensa contra patógenos y estrés abiótico. Además, actúan como pigmentos que atraen a diversos tipos de polinizadores (Plant Polyphenols, 1992).

El tipo y cantidad de metabolitos secundarios varía según la especie y madurez de planta y su ubicación geográfica. En este sentido, una planta sometida a condiciones de estrés aumentará la cantidad de metabolitos como mecanismos de protección ante estímulos (Shalaby and Horwitz, 2015). Por ejemplo, plantas expuestas a mayor radiación ultravioleta tienden a producir más polifenoles como mecanismo de protección (Chen et al., 2022). Estos compuestos no solo contribuyen a la resistencia de la planta, sino que también tienen importancia en la calidad nutricional y medicinal de los productos vegetales.

Existen varias maneras de clasificar los metabolitos secundarios, sin embargo, una forma inicial para entender su procedencia es mediante la ruta biosintética a la que pertenecen, como se observa en la **Figura 4**. En particular, la vía del ácido shikímico, responsable de la síntesis de fenilalanina (aminoácido aromático) y ácido cinámico (Ahmad et al., 2021), se sintetizan los compuestos polifenólicos, compuestos de interés en la salud humana por su potente capacidad antioxidante, alta abundancia y diversidad y tolerancia en el consumo humano. Asimismo, otros compuestos como por ejemplo los carotenoides y glucosinolatos perteneciente a la ruta del ácido mevalínico, también poseen capacidad antioxidante y propiedades en la salud humana. Sin embargo, los polifenoles se distinguen de otros metabolitos ya que poseen capacidad para intervenir en múltiples procesos biológicos. También prevalecen en una amplia gama de alimentos consumidos habitualmente, lo que los convierte en un foco de atención en la investigación relacionada con la prevención de enfermedades crónicas.

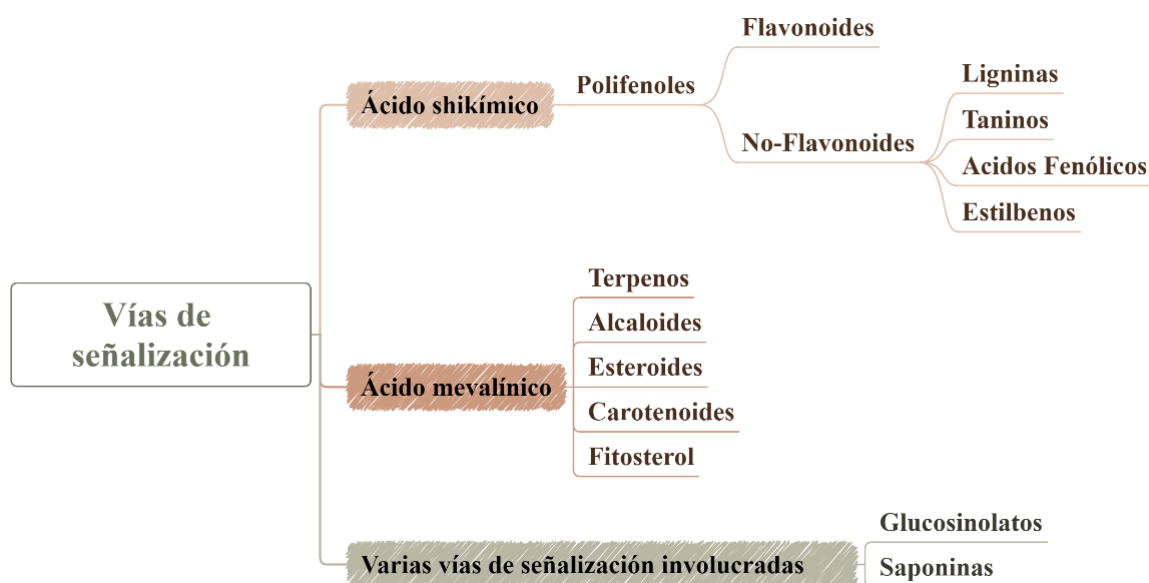


Figura 4 | Vías de señalización para la biosíntesis de metabolitos secundarios.

2.2.1. Estructura de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pertenecen a la familia aromática de los fenoles. El grupo hidroxilo determina su acidez, y el anillo bencénico su alcalinidad (Rappoport, 2003). Estos compuestos, pueden contener uno o más anillos aromáticos, conocidos como grupo fenólico, a los cuales están unidos uno o más grupos hidroxilos (-OH) (Figura 5A y 5B). Existen compuestos fenólicos más complejos conocidos como glucósidos. Están unidos a uno o más grupos de azúcares que se unen a grupos hidroxilos o al anillo aromático (Figura 5C) (Horowitz and Gentili, 1969).

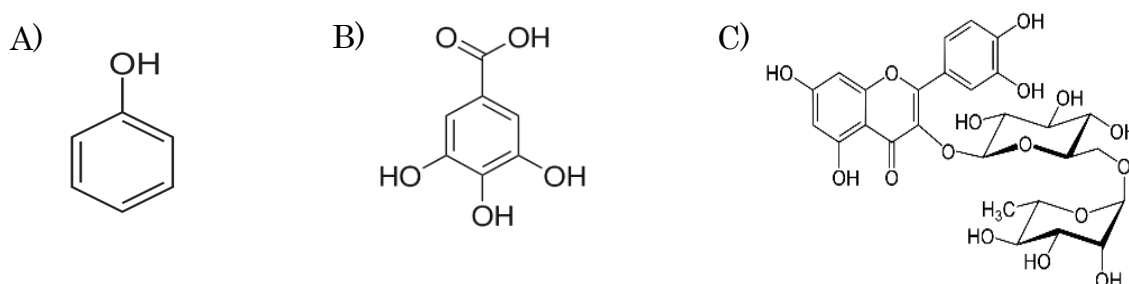


Figura 5 | Estructuras de polifenoles. A) Representación de la estructura simple de un anillo aromático enlazado a grupos hidroxilo (OH). B) Acido gálico, un fenol simple y C) Glucósido de rutina, polifenol unido a un azúcar mediante grupos hidroxilo.

Los polifenoles pueden ser clasificados a partir del número de anillos fenólicos, la presencia de grupos funcionales y la disposición de los grupos hidroxilo en su estructura (Ahmad et al., 2021). Si bien, poseen diferentes estructuras, se pueden clasificar en dos categorías: flavonoides y no-flavonoides (Abbas et al., 2017) (**Figura 7**). Estas categorías se diferencian en el número de átomos de carbono adyacentes al núcleo bencénico (Chaves et al., 2019). Los flavonoides están compuestos por tres anillos (A, B y C), un heterociclo oxigenado conocido como estructura C6-C3-C6 (**Figura 6**). Por otro lado, el grupo no flavonoides, no comparte la estructura C6-C3-C6 y se dividen en ácidos fenólicos (C6-C1), lignanos (C6-C3-C3-C6), estilbenos (C6-C2-C6) y taninos con estructura simple (C6) (Scalbert et al., 2005).

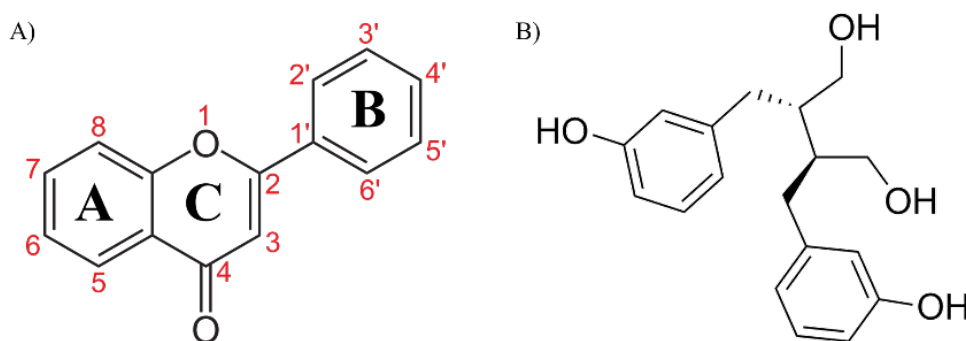


Figura 6 | Diferencia estructural de polifenoles flavonoides y no-flavonoides. (A) Estructura básica de un flavonoide y su enumeración. (B) Enterodiol, representación de una estructura de polifenoles no-flavonoides.

Los polifenoles son una amplia clase de compuestos que incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, entre otros. Estos se encuentran en una variedad de alimentos vegetales como frutas, verduras, té, vino y cacao. La capacidad antioxidante de un polifenol depende de su estructura química, y no es igual en todos los polifenoles. Por ejemplo, algunos flavonoides, como la quercetina y el resveratrol, son conocidos por su fuerte actividad antioxidante, mientras que otros polifenoles pueden tener una capacidad antioxidante menor, o actuar a través de otros mecanismos biológicos que no están directamente relacionados con la neutralización de radicales libres. Además, la capacidad antioxidante también puede depender de factores como la biodisponibilidad del compuesto en el cuerpo, la interacción con otros nutrientes, y la forma en que se metaboliza. Por lo tanto,

aunque los polifenoles en general tienen capacidad antioxidante, esta varía considerablemente entre los diferentes tipos de polifenoles.

Al consumir estos compuestos a través de la dieta, se promueve la salud humana. Su capacidad antioxidante protege las células del estrés oxidativo, que está relacionado con diversas enfermedades crónicas (Manach and Donovan, 2004).

2.2.2. Mecanismo de acción y salud humana.

Los compuestos fenólicos han demostrado ser eficaces en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. Por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis, ya que mejoran la elasticidad de los vasos sanguíneos y ayudan a reducir la inflamación (Tangney and Rasmussen, 2013). Estudios recientes también han evidenciado su impacto positivo en la prevención de trastornos neurodegenerativos, como el Alzheimer y el Parkinson, por su acción en la protección neuronal y la inhibición de agregados proteicos tóxicos (Hooper et al., 2008; Hollman et al., 2010; Kaneko et al., 2011; Li et al., 2012; Gallardo-Fernández et al., 2023). Otro efecto que se les ha atribuido es la regulación del metabolismo de la glucosa, ofreciendo beneficios potenciales en la prevención y tratamiento de la diabetes tipo 2 (Luo et al., 2006; Wang et al., 2010; Henning et al., 2013; Dützmänn et al., 2016; Wong et al., 2016; Ávila-Gálvez et al., 2021).

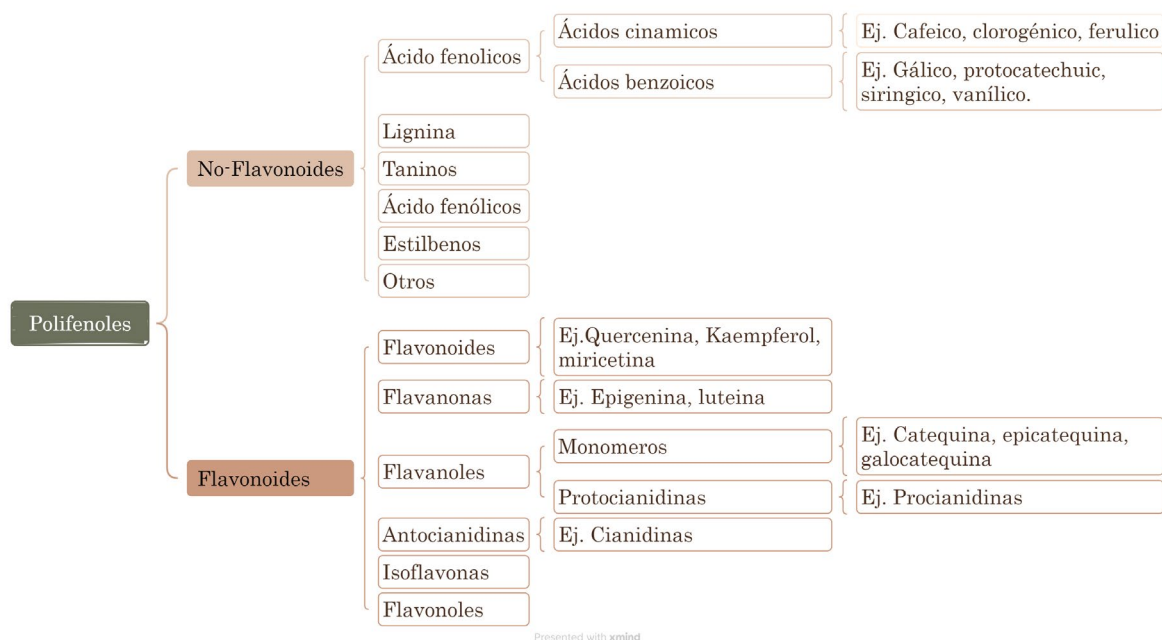


Figura 7 | Clasificación de los polifenoles en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. Entre los flavonoides, se destacan subcategorías como flavonas, flavanoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas. En el grupo de los no flavonoides, se identifican ácidos fenólicos, lignina, taninos y estilbenos. Este diagrama ilustra la diversidad estructural de los polifenoles, reflejando la complejidad.

Por otro lado, se ha observado que los polifenoles pueden jugar un rol en la reducción del riesgo de varios tipos de cáncer, incluyendo el de hígado, mama, cerebral, próstata y colon. Esto ocurre mediante la modulación de las vías de señalización celular y la inducción de apoptosis en células cancerígenas.

La acción de los compuestos fenólicos en su mayoría es gracias a la actividad antioxidante que poseen los polifenoles, ofreciendo protección contra el daño oxidativo inducido por los radicales libres. Estos mecanismos son fundamentales para prevenir el desarrollo de estas enfermedades crónicas.

Antioxidante y su relación con el estrés oxidativo.

Para comprender el efecto antioxidante de los polifenoles, es decir, su acción frente al estrés o daño oxidativo es esencial primero definir qué es el estrés oxidativo, como se produce y el nivel de daño que estos causan.

i. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un proceso en el cual las células experimentan daño y deterioro. Esto es debido a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas, conocidas como radicales libres, junto con la disponibilidad y capacidad de antioxidantes para neutralizarlos (Jaffe and Mani, 2014).

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en su estructura lo que produce inestabilidad en su configuración electrónica, siendo altamente reactivos. Esta reactividad conduce a la constante búsqueda de alcanzar estabilidad mediante la obtención del electrón faltante en otra molécula. Esto genera una cadena de compuestos igualmente inestables, dañando estructuras celulares esenciales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

La producción de radicales libres en las células ocurre en varios organelos y sistemas enzimáticos. Ejemplos son peroxisomas, el sistema de citocromo P450, fagosomas y mitocondrias, siendo estas últimas donde se produce la mayor cantidad de radicales libres. Existen diversos tipos de radicales libres, sin embargo, las especies reactivas de oxígeno (ERO) son las moléculas más dañinas y abundantes. Las ERO incluyen el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el ácido hipocloroso, derivados del oxígeno y generados en procesos metabólicos normales y patológicos.

La mitocondria es fundamental para la producción de energía celular a través de la fosforilación oxidativa, proceso en el que también se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) como subproductos de la oxidación de NADH y FADH₂. Aunque estas moléculas son esenciales para la señalización celular y la defensa inmune, su exceso provoca estrés oxidativo, dañando el ADN mitocondrial, proteínas y lípidos, lo que contribuye a enfermedades como patologías neurodegenerativas,

cardiovasculares y cáncer (Grey, 2000; Armstrong, 2002; Chen et al., 2005; York-Duran et al., 2019; Ganguly et al., 2021; Foyer and Hanke, 2022; Li et al., 2022).

El daño oxidativo al ADN, especialmente en las mitocondrias, puede inducir mutaciones que incrementan la inestabilidad genética y, por ende, el riesgo de cáncer (Salehi et al., 2018). Además, la oxidación de proteínas altera su estructura y función, mientras que la peroxidación de lípidos es un factor en la progresión de trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares (Ayala et al., 2014; Ezraty et al., 2017).

A pesar de que las células cuentan con sistemas antioxidantes para regular la acumulación de ERO, factores externos como el tabaco y la radiación UV pueden aumentar su producción, exacerbando el daño celular y la disfunción mitocondrial, lo que incluye la liberación de factores pro-apoptóticos, favoreciendo aún más el desarrollo de enfermedades crónicas (Sorescu et al., 2002; Erickson et al., 2008; Fecher et al., 2019; Bastian et al., 2021; Sadasivam et al., 2022).

ii. Antioxidantes

Según B. Halliwell, los antioxidantes son sustancias o acciones que retardan, previenen o eliminan el daño oxidativo (Halliwell et al., 1997). Actualmente se conocen como compuestos que tienen la capacidad de neutralizar radicales libres, moléculas productoras de estrés oxidativo y de daño celular.

Estas moléculas desempeñan un papel fundamental en la protección de las células frente al estrés oxidativo. Pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos, dependiendo de su mecanismo de acción. Su función es crucial para preservar la integridad y la homeostasis celular, lo cual es esencial para prevenir el deterioro y envejecimiento, así como diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Leibovitz and Siegel, 1980; Irato and Santovito, 2021; Yañez et al., 2023).

El ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos son las principales dianas de los radicales libres. Así es como los organismos aerobios han desarrollado mecanismos antioxidantes para proteger estos componentes. Estos mecanismos se basan en procesos redox. Este mecanismo se basa en la donación de un electrón o átomo de

hidrógeno al radical libre, estabilizando su electrón desapareado y neutralizando su reactividad. De esta forma se reduce el potencial de daño celular. Hasta ahora se han identificado numerosas sustancias naturales con capacidad antioxidante, como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos y proteínas, buscando minimizar el uso de antioxidantes sintéticos (He et al., 2024).

2.2.3. Obtención de compuestos fenólicos

La obtención de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes es fundamental para diversas industrias. Su importancia radica en su potencial aplicación en la formulación de alimentos funcionales, productos farmacéuticos y cosméticos con efectos beneficiosos para el organismo.

La obtención de compuestos fenólicos requiere una selección meticulosa del método de extracción, con el fin de garantizar tanto la eficiencia del proceso como la conservación de las propiedades bioactivas de los compuestos. Las variaciones en los métodos de extracción pueden tener un impacto significativo en la cantidad y tipo de los compuestos obtenidos. Por ejemplo, la extracción mediante disolventes, un método tradicional ampliamente utilizado, es efectivo, pero puede demandar un tiempo prolongado. Por otro lado, el uso de solventes orgánicos no siempre es recomendable debido a sus posibles efectos adversos. En la **Figura 8**, se observa el tipo de compuesto que se obtiene según el disolvente empleado (Alara and Abdurahman, 2019).

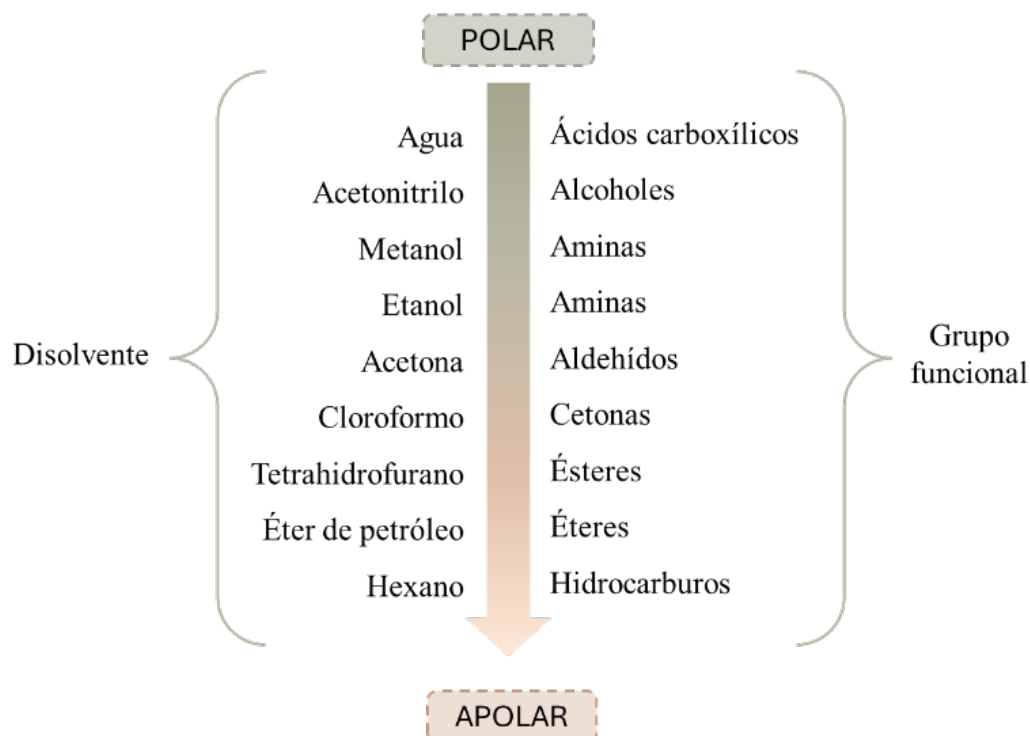


Figura 8 | Clasificación de disolventes y grupos funcionales según su polaridad. Distribución de disolventes comunes y grupos funcionales orgánicos en una escala de polaridad, desde polares a no polares.

En contraste, técnicas más avanzadas, como la extracción asistida por ultrasonido o la extracción con fluidos supercríticos, permiten obtener rendimientos superiores y una mejor preservación de las propiedades antioxidantes. Sin embargo, estas técnicas requieren una mayor inversión en tecnología y equipamiento especializado. Por tanto, debe ser considerado en función de los objetivos y recursos disponibles para la extracción.

Actualmente, existen diversas estrategias de extracción de compuestos, y todas ellas emplean disolventes como base para el proceso de extracción. La elección del disolvente y del método adecuado depende del tipo de muestra y de los compuestos específicos que se desean extraer. Entre los métodos de obtención existen maceración, percolación inferior, infusión, digestión, extracción en serie y Soxhlet (Sticher, 2008; Alara et al., 2018). Alternativas como extracción por CO₂ supercrítico, microondas, ultrasonidos, enzimas y fluidos presurizados pueden aumentar el rendimiento (Kaufmann and Christen, 2002).

Para la obtención de los compuesto fenólicos los disolvente comúnmente utilizados son el etanol y metanol, debido a que son altamente polares, lo que ayuda en su eficacia en la obtención de compuestos fenólicos (Alara et al., 2021). Por ejemplo, en estudios realizados con *S. dulcificum*, estos solventes han permitido extraer aproximadamente el 50% de los fenoles totales presentes en la muestra (Han et al., 2019). En la **Tabla 3**, se observa ejemplos de los disolventes empleado actualmente y su índice de polaridad (Snyder, 1978).

Tabla 3 | Disolventes convencionales utilizados para la extracción de compuestos polifenólicos.

Solvente	Descripción	Índice de polaridad
Agua	Al ser un disolvente inocuo es una opción segura y adecuada para aplicaciones alimentarias y farmacéutica. Es el disolvente con mayor índice de polaridad. Los polifenoles que generalmente se extraen son polares como taninos, ácidos fenólicos y flavonoides.	10,2
Acetona	Este disolvente es un solvente orgánico de polaridad media, se utiliza especialmente en aplicaciones de laboratorio y de investigación. Extrae compuestos de diferentes estructuras y polaridades como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos condensados y estilbenos.	5,1
Metanol	Disolventes polares ampliamente utilizados en la extracción de compuestos fenólicos, con un índice de polaridad cercano al del etanol. Tiene una alta capacidad de extracción y es eficaz para la obtención de una variedad de fenoles. Sin embargo, su toxicidad limita su uso en aplicaciones que involucran productos destinados al consumo humano. Extraer compuestos como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanos, estilbenos.	5,1
Etanol	Corresponde a uno de los disolventes polares más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos, especialmente en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas ya que es seguro para el consumo humano y tiene una buena capacidad para solubilizar una amplia gama de compuestos fenólicos como metanol. flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanos, estilbenos.	4,3
Cloroformo	A pesar de su toxicidad y la preocupación por su impacto ambiental, el cloroformo se ha utilizado en la	4,1

	extracción de compuestos fenólicos apolares, especialmente en investigaciones de laboratorio. Sin embargo, su uso se ha reducido debido a consideraciones de seguridad. Extraer como lignanos, estilbenos y algunos flavonoides apolares	
Cloruro de metileno	Este disolvente apolar es eficaz en la extracción de compuestos fenólicos y se utiliza en aplicaciones de laboratorio y en la industria farmacéutica debido a su volatilidad. Sin embargo, su toxicidad y el potencial carcinogénico hacen que su uso deba manejarse con precaución. Extrae compuestos como lignanos, estilbenos, flavonoides apolares y algunos ácidos fenólicos y sus derivados.	3,1
Hexano	El hexano es un disolvente no polar que se utiliza en la extracción de compuestos fenólicos lipofílicos, como los presentes en aceites vegetales y grasas. Es común en la obtención de antioxidantes de aceites naturales.	0,1
Éter de petróleo	Aunque menos común en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas debido a su toxicidad, el éter de petróleo se utiliza en la extracción de compuestos fenólicos volátiles y no polares.	0,1

A pesar de la efectividad de los disolventes orgánicos, su uso intensivo y la alta producción de residuos generan un impacto ambiental significativo. Estos disolventes, al ser volátiles, reaccionan con otros contaminantes en la atmósfera para formar ozono, contribuyendo a la contaminación del aire. Además, son tóxicos para los organismos acuáticos, ya que cuando se liberan en cuerpos de agua, pueden afectar negativamente a peces, plantas acuáticas y otros organismos. Los derrames y la mala gestión de estos disolventes pueden llevar a la contaminación del suelo y del agua subterránea, lo que a largo plazo puede afectar la calidad del agua potable y la salud de los ecosistemas terrestres. La exposición a disolventes orgánicos también puede tener efectos adversos en la salud humana, incluyendo problemas respiratorios, daños al sistema nervioso central y efectos cancerígenos. Estos riesgos no solo afectan a las personas que trabajan directamente con estos disolventes, sino también a las comunidades cercanas a las áreas contaminadas (Junior et al., 2022). Los disolventes naturales eutécticos profundos, conocidos como NaDES (Natural Deep Eutectic Solvents), pretenden ser solución sostenible y amigable con el entorno.

Los NaDES es el producto de una mezcla de dos o más metabolitos primarios o secundarios sólidos que forman un líquido viscoso con un punto de fusión (solidificación) más bajo que el que poseen dichas sustancias por separado. Motivo por el que estos disolventes son denominados “eutéticos”. El término “profundo” deriva por su capacidad de interactuar con diferentes tipos de solutos y disolver moléculas que no son fáciles de obtener como disolventes tradicionales.

Los NaDES, generalmente son formados por la unión de un donante de hidrógeno (por ejemplo, ácido cítrico, ácido málico o glucosa) y un aceptor de hidrógeno (como cloruro de colina o urea). Mediante la geometría y entorno químico que compone al NaDES forman una matriz ordenada de hidrógenos capaces de capturar los compuestos de interés (Liu et al., 2016).

Estos disolventes se destacan por su biodegradabilidad, son reutilizables, y miscibles en agua. Presentan baja o nula toxicidad, incluso para ciertos procesos no es necesario su remoción puesto que es inocuo para el consumo humano y flora fauna (Paradiso et al., 2016; Choi and Verpoorte, 2019; Ali et al., 2020). La reducción de la huella ambiental en los procesos de extracción los vuelve una opción prometedora y sostenible para el uso industrial. La eficacia de extracción de estos disolventes logra superar una amplia gama de solventes capaz de aumentar el rendimiento en un 200%, y su diseño se puede ajustar para extraer compuestos de manera selectiva (Liu et al., 2018; Ali Redha, 2021).

La eficacia en la extracción de compuestos fenólicos mediante NaDES depende en gran medida de la estructura específica de estas moléculas y de la interacción con los metabolitos presentes en la matriz de extracción. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que NaDES como colina-cloruro + ácido láctico pueden ser especialmente eficaces para extraer flavonoides de matrices vegetales debido a la fuerte interacción de los grupos hidroxilo del fenol con los componentes del disolvente. Asimismo, se ha observado que la composición y polaridad de los NaDES pueden ajustarse para mejorar la selectividad y eficiencia de la extracción. Sin embargo, el estudio de estos disolventes y su relación con los diferentes tipos de compuestos fenólicos aun es un desafío.

2.3. Modelización de sistemas complejos

La modelización de sistemas complejos es una herramienta que ayuda a comprender, predecir y manejar comportamientos que involucra múltiples componentes. Modelar un sistema complejo implica la habilidad de manipular y ajustar parámetros mediante simulaciones computacionales, obteniendo resultados que ayudan a la toma de decisiones (Institute of Biomedical Imaging, 2020).

El aprendizaje automático, o mejor conocido como Machine Learning por su traducción en inglés, es una rama de la inteligencia artificial (IA). Se fundamenta en la utilización de algoritmos y bases de datos para simular el proceso de aprendizaje humano. La finalidad de la IA es desarrollar modelos informáticos que muestren comportamientos inteligentes similares a los humanos, como responder a través de imágenes visuales, texto en lenguaje natural o ejecutar acciones en el mundo físico. Los algoritmos de aprendizaje automático se dividen en tres categorías:

2.3.1. Aprendizaje supervisado

Estos algoritmos se basan en un aprendizaje previo mediante un sistema de etiquetado asociado a ciertos datos, lo que permite tomar decisiones o generar predicciones. En función del tipo de resultado que se necesite (salida), existen dos tipos de modelos: Regresión o Clasificación. Si la variable es continua, es decir, numérica, es considerado un problema de regresión, mientras que si la variable es discreta, es un problema de clasificación. Por ejemplo, la creación de una base de datos con secuencias genéticas que están etiquetadas con presencia o ausencia de ciertas enfermedades hereditarias. Estos modelos pueden predecir la probabilidad de que un individuo desarrolle una enfermedad basándose en su información genética.

2.3.2. Aprendizaje no supervisado

Estos algoritmos tienen como objetivo encontrar patrones que permitan organizar los datos según el nivel de similitudes que existe entre ellos. Este aprendizaje no

cuenta con un sistema de etiquetado, por el contrario, suelen utilizarse como herramientas de agrupamiento. Por ejemplo, al tener patrones de expresión genética con diferentes condiciones, el algoritmo permite agrupar dichos genes indicando que están coregulados o participan en vías metabólicas comunes.

2.3.3. Aprendizaje por refuerzo

Este algoritmo está diseñado para aprender a partir de la experiencia, sin necesidad de datos previamente etiquetados. Se entrena a través de un método de prueba y error dentro de un entorno controlado, donde las decisiones correctas son recompensadas. Por ejemplo, enseñar a un robot a realizar tareas complejas en entornos dinámicos.

La aplicación de aprendizaje automático en el estudio de las propiedades bioactivas de las plantas ha demostrado ser un enfoque prometedor, con estudios recientes como el de Richard-Bollans et al. (2023), donde han desarrollado modelos para predecir el potencial antiplasmodial de diversas especies de plantas. Por otro lado, García-Pérez et al., (2021) han identificado los factores clave implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas medicinales. Además, (Taghadomi-Saberi et al., 2018) han trabajado en la predicción de compuestos volátiles esenciales para clasificar con precisión aceites esenciales. Sin embargo, este campo aún enfrenta desafíos significativos, particularmente en la obtención y predicción de compuestos con propiedades antioxidante relevantes para la salud humana.

En este contexto, la presente tesis aborda estos desafíos mediante la exploración de *S. dulcificum*, una planta de interés por sus potenciales compuestos bioactivos. Para ello, se empleará la herramienta Orange3, un software de código abierto que permite la integración de diversos algoritmos de aprendizaje automático. Esta herramienta es esencial para analizar patrones complejos en los datos y construir modelos predictivos robustos. A través de esta metodología, se busca no solo profundizar en el conocimiento de *S. dulcificum*, sino también abrir nuevas vías para la valorización de otras especies vegetales, promoviendo así la innovación en la creación de “superalimentos”.

3. Objetivos

Valorar las propiedades de la planta *Synsepalum dulcificum*, incluyendo el producto *Dried Miracle Berry* (DMB®), semillas y hojas utilizando disolventes orgánicos para la extracción de compuestos fenólicos, con el fin de explorar su potencial aplicación en las industrias farmacéutica, cosmética y alimenticia; y, paralelamente, evaluar la eficacia de los Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES) en la extracción de compuestos fenólicos y la predicción de su poder antioxidante utilizando machine learning.

3.1. Objetivos Específicos

1. Optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos de *S. dulcificum* (incluyendo DMB®, semilla y hoja) utilizando disolventes orgánicos, evaluando la eficacia de estos extractos mediante el análisis de su capacidad antioxidante.
2. Caracterizar químicamente los extractos obtenidos de DMB®, semillas y hojas de *S. dulcificum* mediante técnicas avanzadas como HPLC y GC-MS.
3. Analizar las propiedades biológicas de los extractos de *S. dulcificum*, evaluando su potencial anticancerígeno e inmunoestimulante mediante estudios con cultivos celulares in vitro.
4. Determinar la seguridad alimentaria de los extractos de DMB®, semillas y hojas de *S. dulcificum* mediante ensayos de hemaglutinación y hemólisis.
5. Evaluar la eficacia de NaDES en la extracción de compuestos fenólicos y predecir la capacidad antioxidante de estos compuestos mediante algoritmos de aprendizaje automático (Machine Learning) basados en la información nutricional de las frutas seleccionadas.

4. Materiales y métodos

La presente tesis se desarrolló en el Centro de Tecnología Biomédica del campus Montegancedo de la Universidad Politécnica de Madrid, España, donde se llevaron a cabo los principales estudios y experimentos. No obstante, una parte significativa del trabajo fue realizada durante una estancia internacional, en la Universidad Católica del Maule en la ciudad de Talca, Chile. En esta estancia el objetivo fue la validación del método de cuantificación antioxidante y la recolección, procesamiento y análisis de diversas frutas de interés empresarial detallados más adelante.

En el desarrollo de este estudio, nos vimos en la necesidad de delimitar el uso de ciertos disolventes y parámetros debido a limitaciones de tiempo y la necesidad de acotar el alcance del estudio. Aunque la metodología inicialmente planteada consideraba un abordaje más amplio, se optó por priorizar aquellos disolventes y materiales vegetales que ofrecían mayor relevancia científica y viabilidad experimental en el contexto de nuestra investigación. En la **Figura 9**, se muestra un esquema de lo que se verá en esta sección de *Materiales y Métodos*.

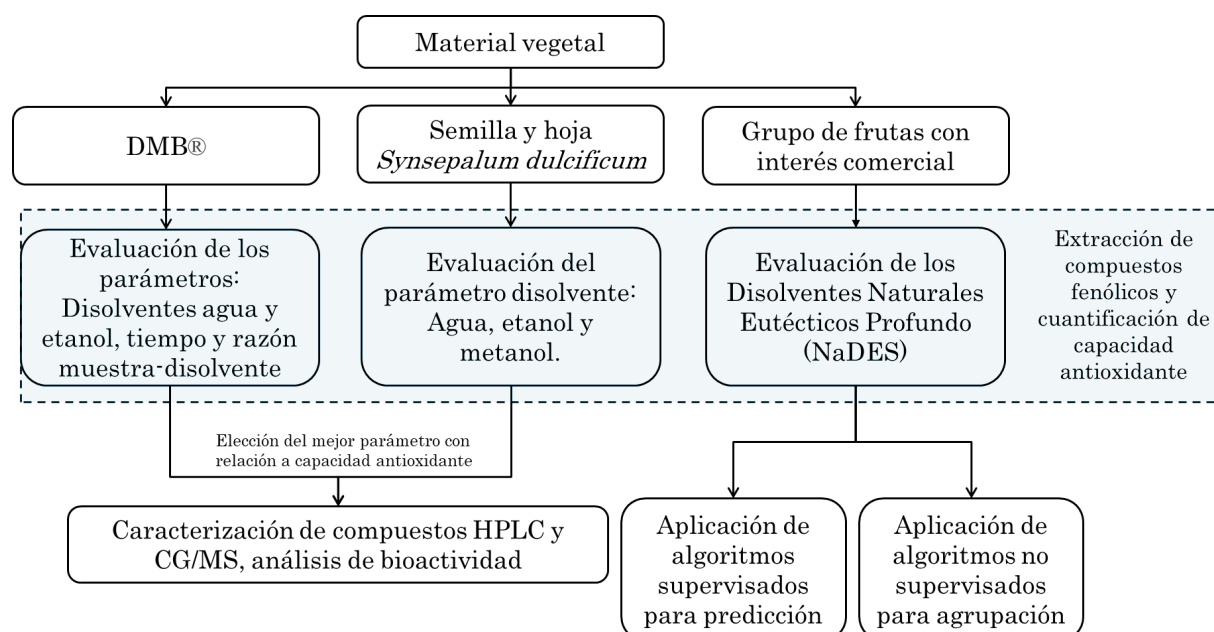


Figura 9 | Esquema general de la metodología empleada en el estudio.

4.1. Material vegetal

4.1.1. *Synsepalum dulcificum* (DMB®, semilla y hoja)

Para el estudio de los compuestos fenólicos de la planta *S. dulcificum*, la empresa Baia Food proporcionó toda materia prima utilizada en este estudio. Donde fueron cosechadas y procesadas en Ghana, África, en el año 2018.

En el caso de la baya de *S. dulcificum*, se utilizó pulpa y piel de la baya. Estas se encontraban liofilizadas y envasadas bajo la marca registrada como DMB®. La fruta se empleó tal como fue comercializada, sin que se realizara ninguna intervención adicional en su procesamiento.

En relación con la semilla, se obtuvieron semillas liofilizadas en Ghana, que se trituraron utilizando una batidora de inmersión (Qilive Q.5336, Croix, Francia) y se almacenaron en frascos de vidrio protegidos de la luz dentro de un desecador a temperatura ambiente (entre 19 y 20 °C). Por otro lado, se obtuvieron también semillas congeladas, las que se descongelaron a temperatura ambiente durante tres horas, se lavaron con agua destilada y se secaron durante 12 horas a 40°C. Se trituraron utilizando una batidora de inmersión (Qilive Q.5336, Croix, Francia) y se almacenaron en frascos de vidrio dentro de un desecador a temperatura ambiente (entre 19 y 20 °C).

Con relación a las hojas, estas fueron transportadas frescas a temperatura ambiente desde Ghana a Madrid. Se lavaron con agua destilada y se eliminó el tallo residual. Posteriormente, se congelaron a -80°C durante 24 horas y se liofilizaron (BIOBASE BK-FD10, Shandong, China) durante 48 horas, a una presión de 0,3mPa y a una temperatura del condensador de -60°C. Posteriormente, se trituraron utilizando batidora de inmersión (Qilive Q.5336, Croix, Francia) y se almacenaron en frascos de vidrio protegidos de la luz en un desecador a temperatura ambiente (entre 19 y 20 °C).

4.1.2. Frutas de interés comercial

Para el análisis del contenido fenólicos y la evaluación de los NaDES, se utilizaron diferentes frutas de interés comercial.

Para ello, la empresa Baía Food proporcionó 15 diferentes frutas: açai (*Euterpe precatoria Mart.*), acerola (*Malpighia emarginata*), arándano (*Vaccinium corymbosum*), banana (*Musa paradisiaca*), frambuesa (*Rubus idaeus*), fresa (*Fragaria ananassa*), guaraná (*Paullinia cupana*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), limón (*Citrus limon*), lúcuma (*Pouteria lucuma*), manzana (*Malus domestica*), maqui (*Aristotelia chilensis*), naranja (*Citrus sinensis*), papaya (*Carica papaya*), piña (*Ananas comosus*). De estas frutas, se utilizaron tanto la pulpa como ya liofilizadas y procesadas por la empresa.

Además, se adquirieron cinco frutas frescas en diversos supermercados en España durante el año 2022: aguacate (*Persea americana*), ciruela (*Prunus domestica*), dátil (*Phoenix dactylifera*), pitaya (*Selenicereus undatus*) y uva (*Vitis vinífera*). Estas frutas se lavaron con agua destilada y se eliminaron las semillas. Posteriormente, las frutas se trituraron utilizando una batidora de inmersión (Qilive Q.5336, Croix, Francia) hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se extendió en una placa de metal con un grosor máximo de 1 cm para asegurar una correcta liofilización. Luego, la mezcla se congeló a -80°C durante 24 horas y se liofilizó (BIOBASE BK-FD10) durante 48 horas, a una presión de 0,3 mPa y a una temperatura del condensador de -60°C. Las muestras liofilizadas se pulverizaron con un mezclador de inmersión (Qilive Q.5336, Croix, Francia), y se almacenaron en frascos de vidrio protegidos de la luz en un desecador a temperatura ambiente (entre 19 y 20 °C).

Por último, se cosecharon 8 frutas frescas en la región del Maule, San Clemente, Chile, y se procesaron en el laboratorio de la Universidad Católica del Maule, Chile siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente. Las frutas fueron: arrayán (*Luma apiculata*), caqui (*Diospyros kaki*), chilco (*Fuchsia magellanica*), feijoa (*Acca sellowiana*), uchuva o golden berry (*Physalis peruviana*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), peumo (*Cryptocarya alba*) y tuna (*Opuntia ficus-indica*).

Para los ensayos de hemaglutinación se utilizó como control positivo alubia cruda (*Phaseolus vulgaris*). La alubia se recolectó en un supermercado de España. Se trituró hasta obtener un polvo homogéneo con una batidora de inmersión, y se almacenó en frascos de vidrio en un desecador a temperatura ambiente (entre 19 y 20 °C).

4.1.3. Infusiones comerciales

Con el propósito de realizar una comparativa de distintas infusiones que están en el mercado actualmente con la hoja de *Synsepalum dulcificum* se obtuvieron distintos tipos de infusión en diferentes supermercados de Madrid, España. De los cuales fueron: verde, blanco, negro, rooibos, jazmin, yerba mate, menta, jazmín y manzanilla y oolong

4.2. Obtención de compuestos fenólicos totales en *Synsepalum dulcificum*

Con el objetivo de identificar las condiciones óptimas para la recuperación de compuestos fenólicos en DMB®, se evaluaron tres parámetros clave: el tipo de disolvente (agua y etanol en concentraciones del 30%, 70% y 100%), la relación peso-volumen de muestra a disolvente (1:10 p/v, 1:50 p/v y 1:110 p/v), y el tiempo de extracción (0, 1, 2 y 3 horas). Previamente se estudió un gradiente de etanol, el cual, consistió en evaluar distintos porcentajes de etanol (10-20-30-40-50-60-70-80-90 y 100 % en DMB® y para contrastar con otras frutas, se utilizaron como control positivo ciruela y arándano, y como control negativo, paraguayana).

Para las muestras de semilla y hoja, se investigaron diferentes disolventes, incluyendo agua, etanol (en concentraciones de 30%, 70% y 100%) y metanol (en concentraciones de 30%, 70% y 100%), manteniendo constante una relación muestra-disolvente de 1:10 p/v y un tiempo de extracción de 1 hora.

Para llevar a cabo las extracciones, se pesaron 50 mg de muestra en frascos de vidrio color ámbar, con el fin de proteger los compuestos fenólicos de la degradación por luz. Se añadió el disolvente correspondiente y la extracción se realizó a temperatura ambiente (19-20 °C) bajo agitación magnética constante.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 8500 g durante 20 minutos a 20 °C. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20 °C, protegido de la luz, hasta su uso posterior. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se realizaron tres ensayos independientes para cada combinación de parámetros.

4.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

4.3.1. Cuantificación de contenido total de fenoles (CTF)

La determinación del contenido total de fenoles (CTF) se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Folin and Ciocalteu, 1927) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de Na₂CO₃ al 20% (p/v) (Labkem, Barcelona, España), la cual se calentó hasta ebullición y se dejó reposar durante 24 horas. Los extractos se prepararon a una concentración de 1 mg/ml en agua destilada. En un volumen de 100 µL del extracto se añadieron 5 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y se dejó reposar durante 15 minutos. Luego, se añadieron 15 µL de la solución de Na₂CO₃ y se incubó durante 2 horas en oscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro (BIOBASE-EL 10A, Shandong, China), se utilizaron disolvente correspondiente de cada muestra como blanco.

Los resultados se expresaron como mg de muestra equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en peso seco (mg/GAE g PS). Expresar la cantidad de compuestos fenólicos en términos de equivalentes de ácido gálico, un polifenol estándar común en la investigación facilita la comparación de resultados. Por ello, se preparó una curva estándar de ácido gálico (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, España). Primeramente, se realizaron diluciones a distintas concentraciones con volumen final de 100 µL utilizando agua destilada (concentraciones 0-2,5-5-10-15-20-25-30 µg/mL). Se agregaron 5 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 15 µL de solución de Na₂CO₃ al 20% y se incubó durante 2 horas en oscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro, utilizando agua como blanco. Se realizaron 3 ensayos independientes.

Se utilizó la siguiente fórmula para expresar los resultados:

$$mg\ GAE / g\ DW = \left(eq \frac{mg}{ml} * \frac{mL}{g} \right) * DF / 1000$$

eq mg/mL: valor interpolado de la curva estándar de ácido gálico; mL: volumen de extracción; g: masa de extracción; DF: factor de dilución.

4.3.2. Cuantificación de contenido total de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó mediante el método de E. Pérez-Pérez et al., 2014 con ciertas modificaciones. Se utilizaron 100 μ L de extracto fenólico a 50 mg/mL, a los que se añadieron 30 μ L de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5% (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, España) y 400 μ L de agua destilada, dejando reposar la mezcla durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 30 μ L de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10% (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, España) y se dejó reposar otros 5 minutos. Finalmente, se añadieron 200 μ L de hidróxido de sodio (NaOH) a 1M (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, España) y 240 μ L de agua destilada. Se utilizó como blanco el disolvente correspondiente en cada caso. La absorbancia se midió a 506 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Quercetina (mg QE/g PS) por gramo de muestra en peso seco (PS). Expresar la cantidad de compuestos fenólicos en términos de equivalentes de quercetina, un flavonoide que se utiliza como estándar común en la investigación, facilita la comparación de resultados.

Para la curva estándar de quercetina (Alfa Aesar Thermo Fisher Scientific, Liverpool, United Kingdom), se realizaron diluciones a distintas concentraciones (20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μ g/mL) en metanol absoluto, con un volumen final de 100 μ L. Estas diluciones se cuantificaron de la misma manera que las muestras, utilizando como control el disolvente metanol. La absorbancia se midió a 506 nm en el espectrofotómetro. Se realizaron 3 ensayos independiente.

4.3.3. Determinación de capacidad antioxidante mediante la eliminación de radicales DPPH•

La determinación de la capacidad antioxidante utilizando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) siguiendo el método descrito por Bondet et al., (1997) con modificaciones. El radical DPPH• es un compuesto estable que se caracteriza por su color violeta intenso en solución, debido a la presencia de un electrón desapareado. Cuando un antioxidante está presente, este puede donar un electrón o un átomo de hidrógeno al radical DPPH•, neutralizándolo y provocando un cambio de color en la solución de violeta a amarillo pálido. La disminución en la absorbancia es directamente proporcional a la capacidad antioxidante del compuesto evaluado.

En placas de 96 pocillos, las muestras se diluyeron a 5 mg/ml con un volumen total de 65 µL en agua destilada. Posteriormente, se agregaron 196 µL de DPPH (aldrich, Minnesota, EE. UU.) a 200 mg/mL preparado en metanol absoluto. Después de 30 minutos de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro (BIOBASE-EL 10A, Shandong, China), utilizando cada disolvente correspondiente como blanco.

Los resultados se expresaron como µmol equivalente de trolox por gramo de muestra en peso seco (µmol trolox/g PS). El trolox es un compuesto fenólico con alta capacidad antioxidante y es utilizado como estándar común en la investigación, lo que facilita la comparación de resultados.

Para la curva estándar de trolox, se realizaron diluciones a distintas concentraciones (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µM) en metanol absoluto, con un volumen final de 100 µL. Estas diluciones se cuantificaron de la misma manera que las muestras, utilizando como control el disolvente metanol. La absorbancia se midió a 506 nm en el espectrofotómetro.

Se utilizó la siguiente fórmula para expresar los resultados:

$$\text{Porcentaje de inhibición [\%]} = \left(\frac{Ac(\text{control}) - As(\text{sample})}{Ac(\text{control})} \right) * 100$$

Ac: absorbancia de DPPH sin extracto (absorbancia inicial)

As: absorbancia DPPH con extracto (absorbancia final).

$$\mu\text{mol trolox g /DW} = \frac{\text{Porcentaje de inhibicion [\%]} \text{ eq } \mu\text{M trolox} * L}{g}$$

L: Volumen de extracción en litros

g: Gramos de extracción

4.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC y CG/MS

4.4.1. Preparación de los extractos

Se extrajeron los compuestos de DMB® con agua y semilla y hoja con etanol al 40% durante 1 hora, a una razón de 1:10 p/v, a 20 °C. Luego, se centrifugó durante 20 minutos a 8500 g y 20 °C. Se obtuvo el sobrenadante y se filtró con una membrana PES de 0,22 µm. Posteriormente, se congelaron a -80 °C durante 24 horas y se liofilizaron durante 48 horas a una presión de 0,0003 Pa y una temperatura del condensador de -60 °C. Posteriormente, se resuspendieron en metanol absoluto y se realizó una dilución de 1:100 v/v. Finalmente, se almacenaron protegidas de la luz a 4°C.

4.4.2. Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Se identificaron 12 compuestos polifenólicos con alta capacidad antioxidante mediante patrones estándar. La información de los estándares utilizados se muestra en **Anexo 3**.

Se realizó mediante análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un sistema HPLC JASCO Serie 4000 (JASCO, España) equipado con un detector de matriz de fotodiodos (DAD), utilizando una columna Fortis C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) a temperatura ambiente.

La detección de los compuestos fenólicos de DMB® se realizó utilizando un detector DAD a las siguientes longitudes de onda: 271 nm para la detección de ácido gálico, ácido protocatéquico y ácido siríngico; 282 nm para la detección de catequina,

vainillina, ácido salicílico y ácido cinámico; 323 nm para la detección de ácido cafeico, ácido *p-cumárico* y ácido trans-ferúlico; y 370 nm para la detección de rutina y quercetina.

Los compuestos se separaron con una elución en gradiente utilizando diferentes proporciones de solución acuosa de ácido acético al 2 % (v/v) (A) y acetonitrilo (B). Las condiciones del método de gradiente fueron las siguientes: inicialmente, 10 % de fase B; a continuación, aumento lineal de 10 % a 21 % de B durante los primeros 6 min; mantenimiento de las condiciones hasta el minuto 12; aumento lineal de B a 35 % de 12 a 15 min; mantenimiento de las condiciones hasta el minuto 22; aumento lineal de B a 50 % de 22 a 28 min; y, por último, disminución lineal a 10 % de B entre 28 y 32 min todo ello en un caudal de 1 mL/min. El reequilibrio de la columna se realizó utilizando las condiciones de partida durante 6 min antes del siguiente ensayo. El análisis total por muestra se realizó en 38 min.

La cuantificación de la extracción de los compuestos se midió mediante el área bajo la curva del pico y se calculó utilizando las curvas de calibración preparadas con soluciones estándar para cada compuesto. Los resultados, expresados como μg de compuesto fenólico por g de peso seco (PS), se obtuvieron utilizando la ecuación:

$$\text{Compuestos fenólicos } (\mu\text{g}/(\text{g PS})) = \frac{[\text{Compuestos fenólicos } (\mu\text{g}/\text{L})]}{(\text{muestra PS (g)})} \times (\text{L disolvente})$$

Donde [compuestos fenólicos] es la concentración de los compuestos fenólicos expresada en $\mu\text{g}/\text{L}$, medida por HPLC y calculada con la curva de calibración; muestra PS, es la cantidad de muestra seca utilizada expresada en g; Y L disolvente, es la cantidad de disolvente utilizado durante la extracción expresada en L.

4.4.3. Análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Se realizó el análisis mediante el equipo Thermo TSQ DUO (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El helio sirvió de fase móvil con un caudal de 1 mL/min, y la temperatura del inyector se mantuvo a 220°C. La columna RTX5-ms se utilizó en las siguientes condiciones: temperatura inicial de 40°C durante 4 min. a 270°C a una velocidad de 12°C/min, que se mantuvo durante 7 minutos. El sistema de espectrometría de masas funcionó en modo de ionización por electrones (EI) a 70 eV.

La interpretación de las masas detectadas se realizó a través del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

4.5. Efecto anticancerígeno en cáncer colorrectal

Los ensayos celulares se realizaron para evaluar el potencial terapéutico de las diferentes partes de la planta de *S. dulcificum* en diferentes contextos biológicos. Se llevaron a cabo pruebas de CI50 (concentración inhibitoria media) en líneas celulares cancerosas para determinar y evaluar la efectividad de los extractos en la posible inhibición del crecimiento tumoral.

La preparación de los extractos se detalla en la sección 4.4.1, página 63. Sin embargo, al obtener el sobrenadante resultante se filtraron con membrana PES 0,22 µm en una campana de flujo laminar para evitar posible contaminación.

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer colorrectal DLD-1, HT-29, SW480 y SW620, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EE. UU.). Estas líneas celulares son modelos utilizados en la investigación del cáncer colorrectal, ya que representan diferentes etapas y perfiles moleculares de la enfermedad. Las líneas DLD-1, HT-29 y SW480 se derivan de tumores primarios de cáncer colorrectal, mientras que la línea SW620 proviene de un sitio metastásico, permitiendo el estudio de la progresión y diseminación del cáncer.

Se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-High Glucose, Dominique Dutscher, Francia) con suero bovino fetal al 10 % (FBS, PAN Biotech,

Alemania), penicilina/estreptomicina al 1 % (Corning, Nueva York, NY, EE. UU.) y L-glutamina 2 mM (FBS, PAN Biotech, Alemania, a 37 °C con 5 % de CO₂ en una incubadora (Series II water Jacker, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Este medio de cultivo suplementado se conoce como medio “DMEM completo”.

Las células utilizadas en este estudio son adherentes, por lo que se deben despegar de las placas de cultivo mediante digestión con la enzima tripsina, proceso que se conoce comúnmente como “tripsinización”.

Para tripsinizar las células, se precalentó una solución de tripsina al 0,25%. Se retiró el medio de cultivo de la placa y se lavaron las células con tampón fosfato salino o sus siglas en inglés PBS 1X estéril.). Luego, se añadió 1 mL de tripsina y se incubó a 37 °C durante 3-5 minutos. La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico estéril y se centrifugó a 300 g durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 1 mL de medio DMEM completo. Posteriormente, se contó el número de células utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido

4.5.1. Ensayo de viabilidad celular (CI50)

La concentración inhibitoria al 50% (CI50) es la cantidad de un fármaco o compuesto químico necesaria para disminuir la viabilidad celular en un 50%. Este valor es esencial para evaluar la eficacia de tratamientos y la toxicidad de diferentes sustancias, ya que señala la dosis necesaria para lograr una reducción significativa en el crecimiento celular.

i. Obtención de CI50

Los ensayos para encontrar el CI50 se realizaron en placas de 96 pocillos para cultivo celular (base plano y un área de 0,33cm²). Se cultivaron 20.000 células por pocillo y se dejaron reposar en un incubador durante 24 horas a 37 °C con 5 % CO₂, este tiempo es para que las células se adhirieran correctamente. Luego, se agregaron los extractos (preparado como medio de cultivo DMEM) a una concentración final de DMB® a 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mg/mL, semilla a las

concentraciones de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/mL; y hoja, 0, 0,1, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8, 2,2 mg/mL y se incubaron 72 horas a 37 °C con 5 % CO₂.

La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT, BioChem, PanreacApplichem, Barcelona, España). Se descartó el medio de cultivo y se añadió una solución de MTT de 0,5 mg/mL, preparada en metanol absoluto. Se incubó durante 4 horas a 37 °C y se eliminó la solución. Los cristales de formazán formados se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Labkem, Barcelona, España).

Finalmente, se midió la absorbancia a 546 nm (BIOBASE-EL 10A, Shandong, China). Se realizaron 3 ensayos independientes con 4 réplicas técnicas cada uno.

4.5.2. Ensayo de exposición crónica

Un ensayo celular con exposición crónica al extracto implica el tratamiento continuo de células cultivadas con una determinada concentración, que suele ser por debajo al CI50 (un rango común es utilizar entre el 10% y el 50% de la CI50) durante un periodo prolongado de tiempo. El objetivo de este tipo de ensayo es simular una exposición sostenida que podría ocurrir en un organismo vivo y observar cómo afecta a las células a largo plazo.

En este ensayo se empleó la línea celular SW620, dado que es una línea metastásica, lo que permite evaluar la eficacia antimetastásica del tratamiento y su capacidad para inhibir la invasión celular. Se seleccionó una concentración de extracto equivalente a un CI3, ya que concentraciones mayores resultaban en la muerte celular a los 7 días.

Los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos tratada para cultivo celular (cada pocillo con base plano y un área de 9.6 cm²). Se cultivaron 2.000.000 células por pocillo. Después de 24 horas se agregaron los extractos a una concentración fija: DMB® 0,811 mg/ml, semilla 0,0133 mg/mL y hoja de 0,072 mg/mL. Se contó el número de células vivas dos veces por semana, despegando las células con tripsina y contando mediante una cámara de Neubauer (Butler and Spearman, 2007).

Posteriormente, para continuar con la exposición de las células al extracto, se volvieron a sembrar 2.000.000 células, manteniendo la concentración del extracto.

El número de células acumuladas se midió con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células acumuladas} = \frac{C(f) * S}{C(i)}$$

Donde $C(f)$ es el número de células obtenidas (final); S , es el número de células acumuladas del conteo anterior (progresión) y $C(i)$, es el número de células inicial (sembradas).

Para evaluar si las células han desarrollado resistencia o sensibilidad al quimiofármaco oxaliplatino tras el tratamiento crónico con los extractos, se realizaron ensayos de viabilidad celular dosis-respuesta. Por ello, se sembraron 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de células tratadas previamente con los respectivos extractos y células controles, es decir, son tratamiento previo. Tras 24 horas de la siembra, se añadieron diferentes concentraciones de oxaliplatino durante 72 horas (0 – 0,040 – 0,097 – 0,19 – 0,39 – 0,78 – 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$).

Se cuantificaron la viabilidad celular mediante el ensayo de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (protocolo en sección 4.5.1, página 57) y se midió la absorbancia a 546 nm. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes con 4 réplicas técnicas cada una.

4.5.3. Análisis de biomarcadores tumorales mediante citometría de flujo

Para observar algún cambio a nivel molecular en las células tratadas de manera crónica a los extractos de semilla y hoja, se analizaron 13 biomarcadores tumorales en los días 11, 22, 32 y 39 (La información de cada anticuerpo se describe en la **Tabla 4**).

La expresión de los diferentes biomarcadores tumorales se analizó mediante citometría de flujo. Las células se digirieron con tripsina (protocolo descrito con anterioridad) y se centrifugaron durante 3 minutos a 300 g 20°C, se lavaron dos veces con PBS 1X y se volvieron a centrifugar. El sedimento se resuspendió en

PBS1X + BSA al 0,5% (albúmina de suero bovino o siglas en inglés BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se incubó con el anticuerpo correspondiente durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para detener la acción de los anticuerpos se diluyeron las muestras con 500µL de PBS 1X y se eliminó mediante centrifugación. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 50 µL de fijador (MARCA) diluido 1/1 con PBS1X + BSA al 0,5%. Se detectaron las células en un citómetro FACS Canto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

Los resultados se expresaron en veces de aumento. La media del porcentaje de expresión de cada biomarcador se dividió con el medio del porcentaje de expresión del control. Estos valores proporcionaron una medida relativa del cambio en la expresión de los biomarcadores

Tabla 4 | Información de anticuerpos para la detección de marcadores tumorales utilizados en este estudio.

Anticuerpo	Dilución	Clon	Secundario conjugado	Referencia	Empresa
anti-BCRP1	sin dilución	5D3	R-ficoeritrina (PE)	130-104-958	Miltenyi Biotec
anti-AC133	1:5	AC133	aloficocianina (APC)	130-113-106	Miltenyi Biotec
anti-RAGE	1:50	--	R-ficoeritrina (PE)	ab237363	Abcam Limited
anti-CD44v6	1:50	REA706	aloficocianina (APC)	130-111-238	Miltenyi Biotec
anti-CD133	1:5	293C3	R-ficoeritrina (PE)	130-113-186	Miltenyi Biotec
anti-LGR5	1:5	REA762	aloficocianina (APC)	130-112-438	Miltenyi Biotec
anti-CD166	sin dilución	3A6 (RUO)	R-ficoeritrina (PE)	559263	BD Pharmingen™
anti-DCLK1	1:5	--	Alexa Fluor® 647	ab202755	Abcam Limited
anti-TROP-2	1:10	162-46(ROU)	R-ficoeritrina (PE)	564837	BD Pharmingen™
anti-CD44	1:5	G44-26(ROU)	aloficocianina (APC)	559942	BD Pharmingen™
anti-CD34	1:5	AC136	R-ficoeritrina (PE)	130-113-179	Miltenyi Biotec
anti-EPCAM	1:5	REA764	aloficocianina (APC)	130-111-000	Miltenyi Biotec
anti-CD36	1:5	REA760	R-ficoeritrina (PE)	130-110-740	Miltenyi Biotec
anti-CD3	1:20	REA613	aloficocianina (APC)	130-113-135	Miltenyi Biotec

4.6. Proliferación linfocitaria

Los ensayos de inmunoestimulación se elaboraron para investigar la capacidad de los extractos de activar y potenciar la respuesta del sistema inmunológico, lo que podría ser beneficioso en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.

La preparación de los extractos se detalla en la sección 4.4.1, página 63. Sin embargo, al obtener el sobrenadante resultante se filtraron con membrana PES 0,22 μm estéril en una campana de flujo laminar para evitar posible contaminación. Se utilizó sangre de individuos sanos procedente del banco de transfusiones de la Comunidad de Madrid. Todas las muestras se recogieron en tubos Vacutainer® con EDTA K3 como anticoagulante.

La obtención de las células mononucleares (linfocitos y monocitos) se llevó a cabo por gradiente de Ficoll (GE Healthcare) a partir de sangre periférica. Se realizó una dilución 1:1 de la sangre con PBS1X y se incorporó lentamente sobre una cama de Ficoll puro a 4 °C (añadida en proporción 1:3 en función de la sangre diluida). Se centrifugó a 300 g durante 30 min a temperatura ambiente, sin aceleración y desaceleración. Se obtuvo las siguientes fases (**Figura 10**).

Se recuperaron las células mononucleadas de la interfase formada por los linfocitos y monocitos, incapaces de penetrar en el Ficoll por su tamaño. A continuación, se realizaron dos fases de lavado con PBS1X, centrifugando durante 5 min a 300 g, 20°C y se recuperó el sedimento que se homogeneizó con un 1mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAN Biotech).

Se contó el número de células obtenidas mediante una cámara de Neubauer (Butler and Spearman, 2007). Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una concentración de 200.000 células/mL con un volumen de 100 μL , y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron los extractos de DMB®, semilla y hoja a una concentración final de 10, 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 horas. Como control negativo se utilizó medio RPMI.

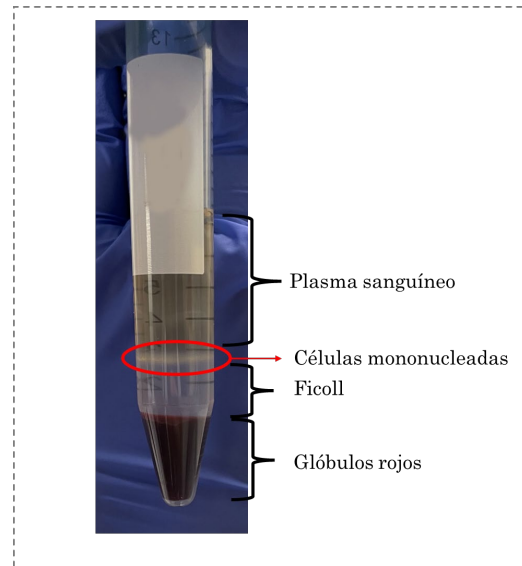


Figura 10 | Separación celular de sangre periférica mediante gradiente de Ficoll. Se muestra 4 fases diferenciadas (de abajo a arriba): Glóbulos rojos; Ficoll; Interfase de células mononucleadas; y la fase superior de plasma sanguíneo.

Posteriormente, se recuperaron las células y se centrifugaron durante 3 minutos a 300 g 20°C , se lavaron dos veces con PBS 1X y se volvieron a centrifugar. El sedimento se resuspendió en $50\text{ }\mu\text{L}$ PBS 1X + BSA al 0,5% y se incubó con $4\text{ }\mu\text{L}$ de los anticuerpos correspondiente durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para detener la acción de los anticuerpos se diluyeron las muestras con $500\text{ }\mu\text{L}$ de PBS 1X y se eliminó mediante centrifugación con las mismas condiciones. Finalmente, el sedimento se resuspendió $50\text{ }\mu\text{L}$ de fijador (MARCA) diluido 1/1 con PBS 1X + BSA al 0,5%. Se detectaron las células en un citómetro FACS Canto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

Las células linfocíticas T se identificaron mediante el antígeno CD3 conjugado con APC (Allophycocyanin), el antígeno CD4, conjugado con PE-Cy7 (Ficoeritrina-Cy7), el antígeno CD8, conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) y las células linfocíticas B mediante el antígeno CD19, conjugado con PE (Ficoeritrina). La información de cada anticuerpo se describe en la **Tabla 5**.

Tabla 5 | Información de anticuerpos para la detección de células linfocitarias utilizados en este estudio.

Anticuerpo	Dilución	Clon	Secundario conjugado	Referencia	Empresa
anti-CD8	1:10	REA734	Ficoeritrina(PE)-Vio® 770	130-110-680	Miltenyi Biotec
anti-CD4	1:10	REA623	Vio® Bright B515	130-114-535	Miltenyi Biotec
anti-CD3	1:20	REA613	Alofococianina (APC)	130-113-135	Miltenyi Biotec
anti-CD19	1:10	REA675	Ficoeritrina(PE)	130-113-646	Miltenyi Biotec

4.7. Análisis de aglutinación y hemólisis

Se realizaron pruebas de hemaglutinación y hemólisis para evaluar la seguridad de los extractos, determinando su capacidad para inducir la agregación de glóbulos rojos o causar la ruptura de las células sanguíneas, respectivamente. Estos ensayos ayudan a comprender el perfil de seguridad con respecto al consumo humano, así como para identificar sus posibles aplicaciones en el desarrollo de tratamientos farmacológicos.

Se utilizaron sangre de individuos sanos con grupos sanguíneos A, B y O, ya que los extractos pueden interactuar de manera diferente con los antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos de cada grupo sanguíneo. La sangre se obtuvo del banco de transfusiones de la Comunidad de Madrid. Todas las muestras se recogieron en tubos Vacutainer® con EDTA K3 como anticoagulante.

Los eritrocitos se obtuvieron mediante centrifugación a partir de sangre periférica. 500 µL de sangre se centrifugó a 300 g durante 5 min a 20°C obteniendo las fases señaladas en la **Figura 10**.

Se eliminó la fase plasmática y células mononucleares. El sedimento se lavó tres veces con PBS 1X, seguido de una centrifugación a 300 g durante 5 min a 20°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se diluyó en 1 mL de PBS 1X. Posteriormente se contó el número de eritrocitos obtenido mediante cámara de Neubauer.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos (cada pocillo con base plano y un área de 0,33cm²). Se sembraron 500.000 células por pocillo. Se añadieron los extractos a una concentración inicial de 5 mg/mL (preparación de los extractos se

detalla en el apartado **4.4.1, página 63**). Se realizaron diluciones seriadas en una proporción de 1:2 utilizando PBS 1X. Tras asegurar la homogeneización, se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres microfotografías para cada condición mediante un microscopio óptico a 200X (LEICA DMI 300 B, Alemania). Se realizaron 3 experimentos independientes. Las concentraciones de las muestras según la dilución realizadas se detallan en la **Tabla 6**.

Tabla 6 | Concentración de extractos utilizados para el ensayo de hemaglutinación y hemolisis.

	Dilución experimental de los extractos							
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
DMB [®]	5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	0,625 mg/mL	0,312 mg/mL	0,156 mg/mL	0,078 mg/mL	0,039 mg/mL
Hoja	5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	0,625 mg/mL	0,312 mg/mL	0,156 mg/mL	0,078 mg/mL	0,039 mg/mL
Semilla	5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	0,625 mg/mL	0,312 mg/mL	0,156 mg/mL	0,078 mg/mL	0,039 mg/mL
Alubia	5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	0,625 mg/mL	0,312 mg/mL	0,156 mg/mL	0,078 mg/mL	0,039 mg/mL
Suero fisiológico	0,90%	0,45%	0,23%	0,11%	0,06%	0,03%	0,01%	0,01%

4.8. Disolventes alternativos para la obtención de polifenoles y miraculina

4.8.1. Elaboración de disolventes eutécticos profundos (NaDES)

Para elaborar los NaDES, se realizó una búsqueda bibliográfica y se seleccionaron las mezclas con mayor obtención de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Se prepararon según las especificaciones de cada estudio. Sin embargo, los NaDES presentaron una viscosidad elevada que dificultaban la manipulación a temperatura ambiente por lo que se cambió su conformación inicial añadiendo agua.

Los reactivos se pesaron en una balanza analítica SI-234 (Denver Instrument Denver, Colorado, U.S.A.) y se añadieron en frasco de vidrios. Posteriormente se añadió agua en porcentaje peso/volumen (%p/v). Se homogeneizaron mediante agitación magnética a 80°C durante 1 a 3 horas hasta obtener un líquido traslucido como se ve en la **Figura 11 B**. Posteriormente, se almacenaron a 4°C hasta su uso en la extracción de compuestos fenólicos. Las relaciones molares de los NaDES y

su composición son información confidencial; por lo tanto, se han asignado códigos que se utilizarán en adelante (Tabla 7).

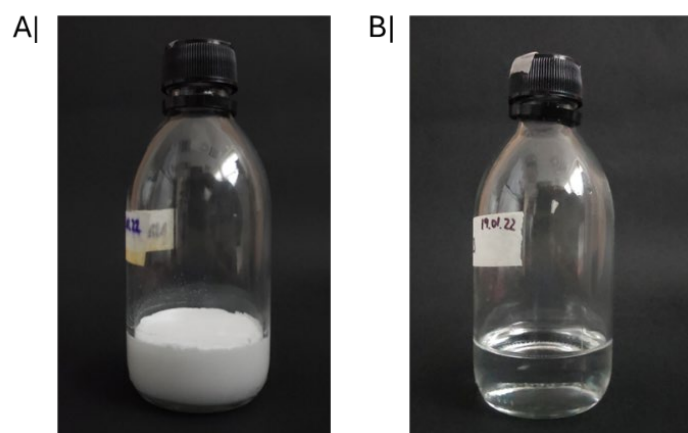


Figura 11 | Evolución visual de la preparación del NaDES bajo aplicación de temperatura. La figura muestra dos etapas en la preparación de un NaDES mediante la aplicación de calor y agitación constante. A) NaDES 1 hora. B) NaDES completamente homogéneo tras 3 horas de tratamiento térmico y agitación.

Tabla 7 | Composición de disolventes naturales eutécticos profundos usados en el presente estudio.

Código	Compuesto 1	Compuesto 2	Ratio Molar	% Agua
NaDES 1				
NaDES 2				
NaDES 3				
NaDES 4				
NaDES 5				
NaDES 6				
NaDES 7				
NaDES 8				
NaDES 9				
NaDES 10				
NaDES 11				
NaDES 12				
NaDES 13				
NaDES 14				
NaDES 15				
NaDES 16				
NaDES 17				
NaDES 18				
NaDES 19				
NaDES 20				
NaDES 21				
NaDES 22				
NaDES 23				
NaDES 24				
NaDES 25				
NaDES 26				
NaDES 27				
NaDES 28				
NaDES 29				
NaDES 30				
NaDES 31				

4.8.2. Extracción de compuestos fenólicos con NaDES y cuantificación de capacidad antioxidante

Con el propósito de evaluar el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de los NaDES elaborados en el apartado anterior (4.8.1, página 73) en relación con disolvente convencional etanol al 70%, se realizaron extracciones de compuestos a distintos tipos de frutas con interés comercial. El procesamiento de las frutas se detalla en el apartado 4.1. página 57. Las frutas incluidas fueron : açai (*Euterpe precatoria Mart.*), acerola (*Malpighia emarginata*), arándano (*Vaccinium corymbosum*), banana (*Musa paradisiaca*), frambuesa (*Rubus idaeus*), fresa (*Fragaria ananassa*), guaraná (*Paullinia cupana*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), limón (*Citrus limon*), lúcuma (*Pouteria lucuma*), manzana (*Malus domestica*), maqui (*Aristotelia chilensis*), naranja (*Citrus sinensis*), papaya (*Carica papaya*), piña (*Ananas comosus*), aguacate (*Persea americana*), ciruela (*Prunus domestica*), dátil (*Phoenix dactylifera*), pitaya (*Selenicereus undatus*), uva (*Vitis vinífera*) y DMB®.

Las frutas arrayán (*Luma apiculata*), caqui (*Diospyros kaki*), chilco (*Fuchsia magellanica*), feijoa (*Acca sellowiana*), uchuva o golden berry (*Physalis peruviana*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), peumo (*Cryptocarya alba*) y tuna (*Opuntia ficus-indica*) se procesaron y analizaron en el laboratorio de la Universidad Católica del Maule, Chile mediante una estancia internacional.

Se pesaron 150 mg de cada muestra de frutas liofilizadas en frascos de vidrio color ámbar para proteger los compuestos fenólicos de la degradación por luz. Se añadieron 1.5 mL de NaDES. La extracción de compuestos fenólicos se realizó mediante agitación magnética constante (SBS-MR-1600/6, Expondo, Berlín, Alemania) durante 1 hora a 40°C. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 1.5 mL de agua destilada directamente a cada muestra, se homogeneizaron y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL. Se centrifugaron a 8.500 g durante 20 minutos a 20°C. El precipitado resultante se descartó y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

Posteriormente, se cuantificaron la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante el protocolo detallado en el apartado **4.3.3, página Determinación de capacidad antioxidante mediante la eliminación de radicales DPPH•**

4.8.3. Obtención y cuantificación de miraculina de DMB®

Para determinar si los NaDES son más efectivos que un tampón de extracción de proteínas en la extracción de miraculina, se realizó un experimento de extracción utilizando DMB®

i. Extracción proteica de miraculina

Se pesaron 100 mg de DMB® en frasco de vidrio y se añadieron directamente sobre la muestra 1 mL de cada NaDES descrito en la **Figura 7**. La extracción se realizó mediante agitación magnética durante 1 hora a 40 °C. Pasado el tiempo, se añadió 1 mL de agua destilada para diluir la mezcla. Se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 20 °C. Se recuperó el sobre sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso. Como control se utilizó un tampón estandarizado por la empresa Medicinal Gardens S.L. (Baia Food).

ii. Cuantificación de miraculina

Para visualizar y comparar el contenido de miraculina obtenido con cada NaDES y el control, se utilizó la técnica de Western Blot. Para ello, primeramente, se cuantificó el contenido de proteínas totales mediante el kit de BCA (MerckMillipore). Sin embargo, las muestras presentaron un color rosa, color que interfiere con la cuantificación real, motivo por el que se cargó el mismo volumen de muestra para todas las condiciones utilizadas.

Para la electroforesis, las muestras se procesaron con el tampón de carga Thermo Fisher (basado en SDS y DTT), asistido por una incubación de 5 min a 96 °C. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Para ello, se utilizaron geles de acrilamida:bis-acrilamida (relación 29:1) al 12%, con el kit de electroforesis *Bolt™*

Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific) funcionando a 100 V durante 1 h a temperatura ambiente.

Una vez realizada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa utilizando el equipo de transferencia en seco *iBlot® 2* (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó un programa de 10 min, basado en un primer paso de 5 min a 20 V, un segundo de 3 min a 23 V y un tercero de 2 min a 25 V. Una vez transferidas las proteínas, se bloquearon las membranas con leche infantil en polvo al 5% en PBS 1X durante 1 h en agitación orbital a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario IgG anti-miraculina de conejo 1: 20.000 (Lifestein) (preparado con leche infantil al 1X) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X durante tres minutos, luego se incubó con anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra, conjugado con HRP 1: 4.000 (Merck Millipore) (preparado con leche infantil 1X). Finalmente, las membranas, ya incubadas, se expusieron al sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific™, Waltham, USA) durante 3 min y se revelaron utilizando la cámara CCD de quimioluminiscencia *ImageQuant LAS 500* (GE Healthcare).

Para analizar los resultados, se empleó el programa de procesamiento digital ImageJ v.1.50, que permite interpolar los resultados obtenidos en Western Blot. la intensidad de la banda obtenida con el tampón se consideró como un 100%.

4.9. Modelamiento matemático

Con el objetivo de determinar cuál NaDES es más adecuado según el tipo de fruta, se aplicaron distintos algoritmos de aprendizaje automático, los cuales se detallan a continuación. Este análisis se realizó en función del porcentaje de capacidad antioxidante de los compuestos obtenidos (ver sección 4.8.2, página 75), Para ello, se intentó identificar correlaciones entre los NaDES y la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, y evaluar si es posible predecir esta capacidad antioxidante utilizando la información nutricional de las frutas.

Para poder cumplir con este objetivo, primeramente, se crearon dos bases de datos: “Características nutricionales de las frutas” y “Capacidad antioxidante de compuestos obtenidos mediante NaDES de distintas frutas”.

4.9.1. Base de datos 1: Características nutricionales de las frutas

Se recopiló información nutricional de las frutas evaluadas en la sección 4.8.2, página 75 mediante una revisión bibliográfica usando como fuente páginas gubernamentales, como (USDA Agricultural Research Service, 2022) y artículos científicos de alto impacto.

Para cada tipo de fruta, se recopilaron 69 parámetros relacionados con su perfil nutricional, incluyendo macro y micronutrientes, proteínas, hidratos de carbono, grasas totales, fibra, minerales, aminoácidos, ácidos orgánicos, fitoesteroles y polisacáridos (Figura 12). En el Anexo 1, se muestra la base de datos completa.

	Acai	Acerola	Aguacate	Arandano	Banana	Ciruela	Datil	Frambuesa	Fresa	Guaraná
Energía total(Kcal)	130	32	233	64	98	48.1	89.45	57	36	335
Proteína (g)	2	0.4	1.88	0.63	1.06	0.63	1.88	1.31	0.81	13.5
Hidratos carbono (g)	5	8.3	0.4	14.6	23	10.2	65.1	12.9	7.96	50.5
Azúcar (g)	2	0.4	0.7	0.36	15.8	9.9	66.5	2.6	4.86	1.1
Fibra (g)	5.3	1.1	6.33	2.4	2.6	1.5	6.7	6.5	2	3.8
Fibra soluble (g)	1.27	0.1	1.4	1.7	1	0.7	2.8	2.2	0.6	3.45
Fibra insoluble (g)	3.8	1	4.9	0.7	1.6	0.8	3.9	4.3	1.4	0.35
Grasa total (g)	49	0.3	23.5	0.6	0.27	0.17	0.45	0.3	0.4	2.3
Ácidos Grasos Saturados (g)	0.88	0.1	1.9	1	0.12	0.02	0.15	0.01	0.03	0.6
Ácidos Grasos Monoinsaturado (g)	0	0.1	15.48	1	0.04	0.05	0.15	0.03	0.06	0.8
Ácidos Grasos Poliinsaturado (g)	4.39	0.1	1.87	1	0	0.08	0.03	0.2	0.24	0.6
Agua (g)	85	91	67.9	84.2	75.3	87.4	23.9	85.6	90.8	98.35
Calcio (Ca) (mg)	35	12	12	12	5	8.3	63	16	17	16
Hierro(Fe) (mg)	0.63	0.2	0.49	0.34	0.4	0.26	1.9	0.45	0.26	5.4
Magnesio(Mg) (mg)	60	18	30	2.4	28	7.9	50	19.2	12.5	77
Zinc (Zn) (mg)	1	0.2	0.4	0.09	0.16	0.09	0.3	0.22	0.11	3.3
Selenio(Se) (ug)	1	0.6	0.4	0.1	2.5	0.59	3	1.3	1.3	0
Sodio (Na)(mg)	26	7	4.7	1	4	1.7	8	2.5	2	6
Potasio(K)(mg)	105	1677	487	78	370	177	650	156	161	1042

Figura 12| Base de datos 1: Propiedades nutricionales de frutas. Debido al tamaño del archivo, sólo se muestra un ejemplo parcial. Las filas corresponden a las propiedades nutricionales y las columnas a las variedades de frutas.

4.9.2. Bases de datos 2: Capacidad antioxidante de compuestos obtenidos mediante NaDES de distintas frutas.

Las frutas utilizadas, la extracción y cuantificación de la capacidad antioxidante de los compuestos obtenido con cada NaDES se detallan en la sección 4.8.2, página 75. La capacidad antioxidante de los compuestos obtenidos de las frutas se recopiló como porcentaje (%) de inhibición del radical (Figura 13). Se utilizó etanol al 70% como disolvente para realizar la comparación (protocolo e interpretación de cuantificación de capacidad antioxidante en la sección 4.3.3, página 62).

	Acai	Acerola	Aguacate	Arandano	Banana	Ciruela	Datil	Frambuesa	Fresa	Guaraná
NaDES 1	0,00	39,50	20,81	17,13	8,66	2,46	23,50	24,73	22,71	20,64
NaDES 2	16,89	22,70	16,28	61,06	6,88	28,09	11,43	65,35	32,70	62,99
NaDES 3	17,14	11,23	15,62	62,05	3,41	25,86	4,86	39,72	25,57	67,22
NaDES 4	32,67	55,68	17,22	82,15	7,80	43,77	7,44	84,81	66,88	87,13
NaDES 5	4,06	8,35	18,74	64,84	8,75	21,25	13,35	61,89	41,73	73,41
NaDES 6	27,78	24,50	19,64	70,61	9,08	48,86	14,93	55,10	63,11	68,65
NaDES 7	24,55	25,22	17,05	71,59	9,67	38,98	13,78	45,05	54,27	81,48
NaDES 8	37,84	54,04	10,59	82,63	7,12	33,54	7,13	49,22	48,29	90,07
NaDES 9	36,61	74,84	7,97	73,96	3,42	39,42	2,45	48,00	41,92	89,29
NaDES 10	26,37	23,93	10,41	57,81	0,92	23,40	2,99	42,62	40,55	72,11
NaDES 11	23,40	19,95	17,60	51,58	1,02	32,70	15,27	19,90	44,13	67,55
NaDES 12	8,77	10,86	11,91	0,00	9,64	0,00	9,52	2,98	0,00	0,00
NaDES 13	17,45	55,48	11,97	61,64	0,00	23,22	9,30	33,95	41,31	67,51
NaDES 14	25,60	28,54	15,25	71,53	5,93	31,61	14,60	53,99	55,64	73,45
NaDES 15	25,04	31,53	17,21	74,42	2,69	34,46	13,46	37,76	47,03	83,10
NaDES 16	31,35	32,08	24,57	80,84	0,00	39,90	10,22	45,09	52,93	89,90
NaDES 17	24,40	14,62	10,90	63,28	0,00	29,46	4,73	46,08	30,79	74,84
NaDES 18	27,64	23,73	15,51	60,77	3,48	36,26	13,46	66,41	41,92	81,27

Figura 13 | Base de datos 2. Propiedad antioxidante de distintas frutas obtenida mediante los disolventes naturales eutécticos profundos. Debido al tamaño del archivo, sólo se muestra un ejemplo parcial. Las filas corresponden al porcentaje de inhibición del radical DPPH y las columnas a las variedades de frutas.

Una vez obtenidas las dos bases de datos, se analizaron utilizando el programa informático Orange3 (Demšar et al., 2013). Esta plataforma está orientada a realizar análisis de aprendizaje automático. La plataforma de este software de código abierto posee un panel intuitivo y visual. Mediante elementos (Widgets) permite la creación de flujos de procesos conectados, como se muestra en la **Figura 14**.

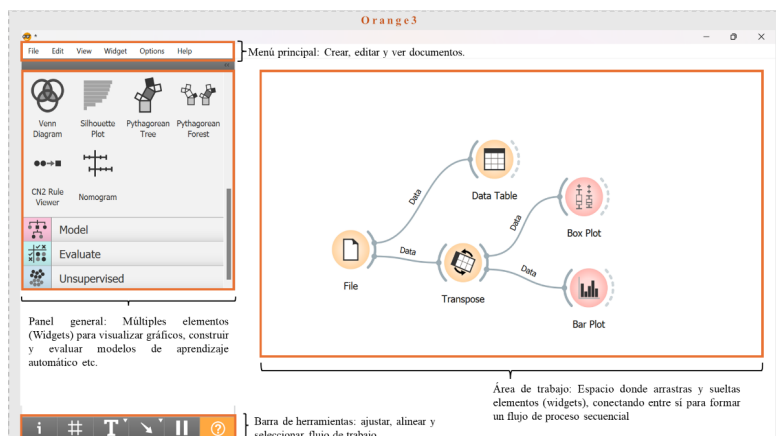


Figura 14 | Interfaz del software Orange3. La imagen muestra el menú principal, panel de widgets, área de trabajo y la barra de herramienta del software Orange 3.

4.9.3. Algoritmos aprendizaje automático supervisados

Se implementaron algoritmos de aprendizaje supervisado de regresión con el objetivo de predecir las propiedades antioxidantes en función de las características nutricionales de las frutas. Para ello, se probó una gama completa de algoritmos disponibles en Orange 3, seleccionando el modelo que mejor se ajustaba según los criterios de error cuadrático medio (MSE) y el coeficiente de determinación (R^2). Este enfoque permitió identificar los predictores más significativos y sus correlaciones, facilitando una interpretación más profunda de los datos nutricionales.

i. Regresión lineal

La ecuación lineal intenta relacionar un conjunto de valores independiente (x) y valores dependientes (y) mediante una relación lineal. Los valores de entrada (x) como el valor de salida (y) son variables continuas (numéricas). El modelo de regresión lineal simple utiliza una única variable independiente para predecir el valor de la variable dependiente y, el modelo de regresión lineal múltiple utiliza más de una variable independiente para predecir el valor como lo es en nuestro caso.

El modelo estadístico de regresión lineal múltiple se representa como:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i x_i$$

Donde, y es la variable dependiente (capacidad antioxidante), x representa las variables independientes (características nutricionales), β_0 es la intersección con el eje y cuando el valor de x es 0 y β_i el coeficiente de regresión que indican la relación entre cada característica y la capacidad antioxidante (consultar **Anexo 4** para ver su uso en Orange3).

ii. Máquinas de vectores de soporte para regresión (SVR) (Support Vector Machine)

La Máquinas de Vectores de Soporte para regresión (SVR) es un método que busca encontrar un hiperplano que prediga valores de salida minimizando los errores de predicción dentro de un margen de tolerancia ϵ , donde los errores menores no son penalizados. Los vectores de soporte, que son los puntos de datos en los límites del

margen o fuera de él, determinan la posición y orientación de este hiperplano. El modelo también introduce C que controla la penalización de los errores fuera del margen, permitiendo ajustar la flexibilidad del modelo (**Figura 15**) (consultar **Anexo 7** para ver su uso en Orange3).

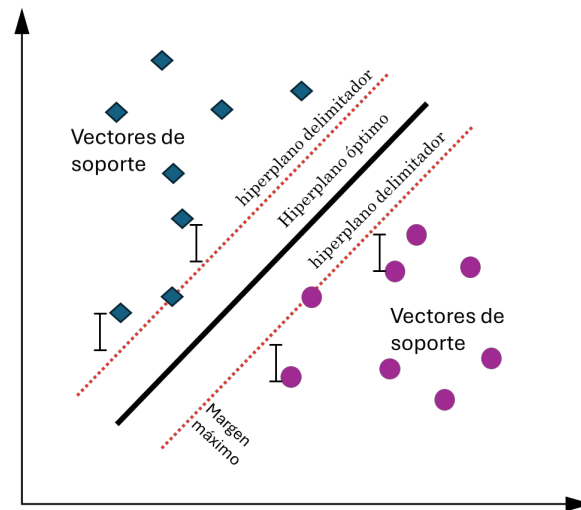


Figura 15 | Representación de clasificación o regresión mediante una Máquina de Vectores de Soporte (SVM). Los puntos azules y morados representan dos clases diferentes de datos. La línea negra sólida es el hiperplano que separa las dos clases, mientras que las líneas rojas discontinuas representan los márgenes de separación. Los vectores de soporte, que son los puntos más cercanos al hiperplano, están destacados.

iii. Vecinos más cercanos (Knn) (K-Nearest Neighbors)

Este modelo se basa en la proximidad o similitud entre los datos. Para predecir un valor continuo (en caso de regresión) este algoritmo encuentra los K puntos de datos más cercanos y calcula la media o mediana de sus valores. El cálculo de distancia más común es de Euclidiana, representado con la siguiente fórmula:

$$d(p, q) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2}$$

Donde p es el valor del primer punto (características de nueva fruta) y q representa el segundo punto (característica de fruta de referencia) (consultar **Anexo 8** para ver su uso en Orange3).

iv. Diagrama de árbol (Tree)

Es un algoritmo que construye un modelo de decisiones en forma de árbol, seleccionando una característica y un punto de división que mejor separa los datos creando nodos internos que representa decisiones basados en características y dirige el flujo hacia otros nodos. Las ramas conectan los nodos y representa el resultado de la prueba y las hojas representan la predicción final del modelo a una etiqueta de clase (calificación) o un valor continuo (en regresión) (**Figura 16**) (consultar **Anexo 5** para ver su uso en Orange3).

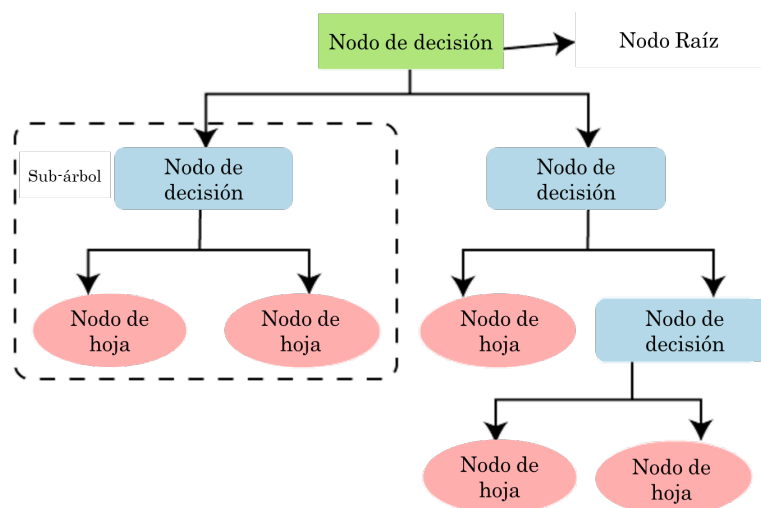


Figura 16 | Representación de un diagrama de árbol de decisión, para predecir la clase del conjunto de datos dado. El nodo raíz (Root Node) se divide en nodos de decisión (Decision Node) que, a su vez, se dividen en nodos hoja (Leaf Node). Los nodos de decisión representan puntos de ramificación basados en criterios específicos, mientras que los nodos hoja representan las clasificaciones finales o resultados. Este diagrama es una referencia para el uso de árboles de decisión en machine learning, donde se utilizan para la toma de decisiones y clasificación de datos.

v. Random Forest

Este algoritmo consta de la creación de múltiples árboles a partir de sub-conjuntos de datos. Cada árbol de decisión se entrena de manera individual y se genera una predicción, como la capacidad antioxidante. Luego, estas predicciones se promedian (**Figura 17**)

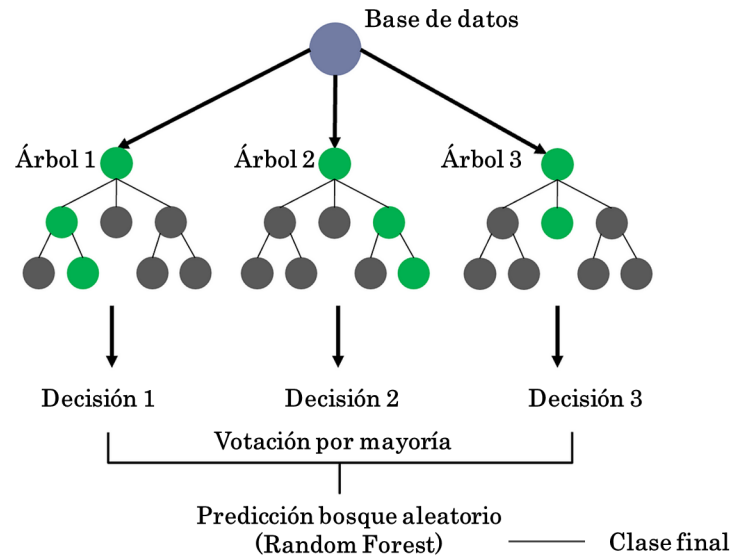


Figura 17|Representación del algoritmo de aprendizaje automático Árbol aleatorio (Random Forest). La figura muestra cómo el conjunto de datos se utiliza para entrenar múltiples árboles de decisión (Árbol 1, Árbol 2, Árbol 3), cada uno generando una predicción (Decisión 1, Decisión 2, Decisión 3). La predicción final del modelo se obtiene al seleccionar la decisión más común entre las predicciones realizadas por los árboles individuales (consultar **Anexo 8** para ver su uso en Orange3).

4.9.4. Algoritmos aprendizaje automático no supervisados

Con el objetivo de identificar patrones y agrupaciones intrínsecas en las dos bases de datos, se realizaron análisis de agrupamiento, conocidos comúnmente como 'clustering' o 'clústeres'. Para ello, se aplicaron tres técnicas principales:

i. **K.medias o K-means**

K-means es un algoritmo de agrupamiento que organiza un conjunto de "n" observaciones en "K" grupos o clusters. Cada observación se asigna al clúster cuyo centroide (media de las observaciones del grupo) se encuentra más cercano en términos de distancia. Este proceso de asignación de puntos a los clústeres se genera repetidamente, ya que el algoritmo busca una configuración óptima en la que tanto las posiciones de los centroides como las asignaciones de los puntos permanezcan estables, tal como se ilustra en la **Figura 18**.

Este algoritmo señala valores para cada clúster generado, denominado “valor de la silueta” o en inglés “Shiloutte”. Silueta es una métrica utilizada para evaluar la calidad del agrupamiento del clúster generado mediante K-medias. Este valor varía entre -1 y 1, donde:

- ❖ 1: Indica que el punto está bien agrupado dentro de su clúster y está lejos de otros Clústeres.
- ❖ 0: Indica que el punto está en el borde entre dos Clústeres.
- ❖ -1: Indica que el punto podría estar mal agrupado, posiblemente asignado al clúster incorrecto.

(consultar **Anexo 14** para ver su uso en Orange3).

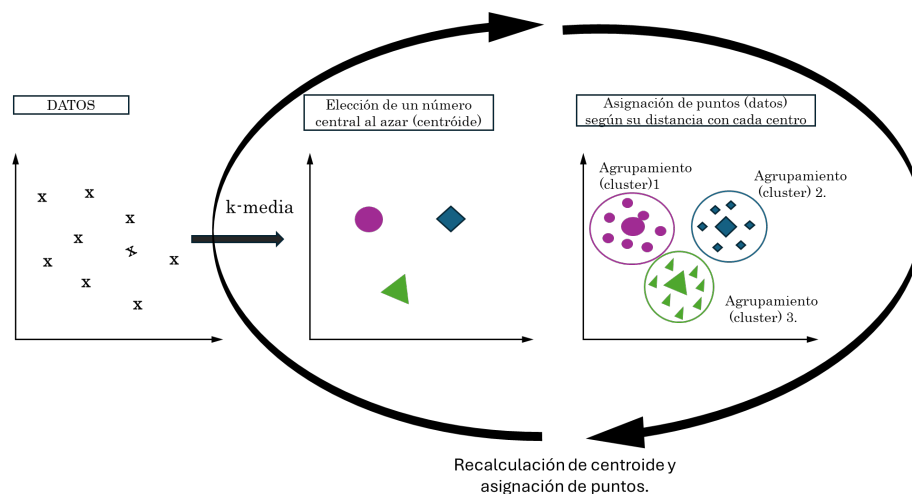


Figura 18 | Representación del algoritmo de agrupamiento K-medias. La imagen muestra cómo los puntos de datos inicialmente distribuidos (izquierda) se agrupan en tres clústeres distintos (derecha). Cada clúster está representado por un color diferente, y los puntos dentro de cada clúster están más cerca de su centroide correspondiente.

ii. Agrupación jerárquica o Clustering Jerárquico

La agrupación jerárquica es un algoritmo que organiza y clasifica los datos calculando distancias entre los valores mediante una matriz de proximidad, con el objetivo de detectar patrones y agrupar elementos con cierto grado de similitud. Los datos se muestran de forma jerárquica en estructura de árbol, mostrando el

número de grupos formado, denominado dendrograma. Usualmente se usa la función de distancia euclidiana, representada con la siguiente fórmula:

$$d(p, q) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2}$$

El proceso de clasificación comienza con el cálculo de la matriz de distancias entre cada par de puntos en el conjunto de datos. Inicialmente, cada punto de datos se considera un clúster individual, y en cada paso, se identifican y fusionan los grupos más cercanos, continuando este proceso hasta que todos los puntos se agrupan en un solo clúster grande. A medida que los grupos se fusionan, se construye el dendrograma, donde la altura en la que se unen dos grupos representa la distancia entre ellos, mostrando así el grado de similitud entre los diferentes grupos (**Figura 19**) (consultar **Anexo 10** para ver su uso en Orange3).

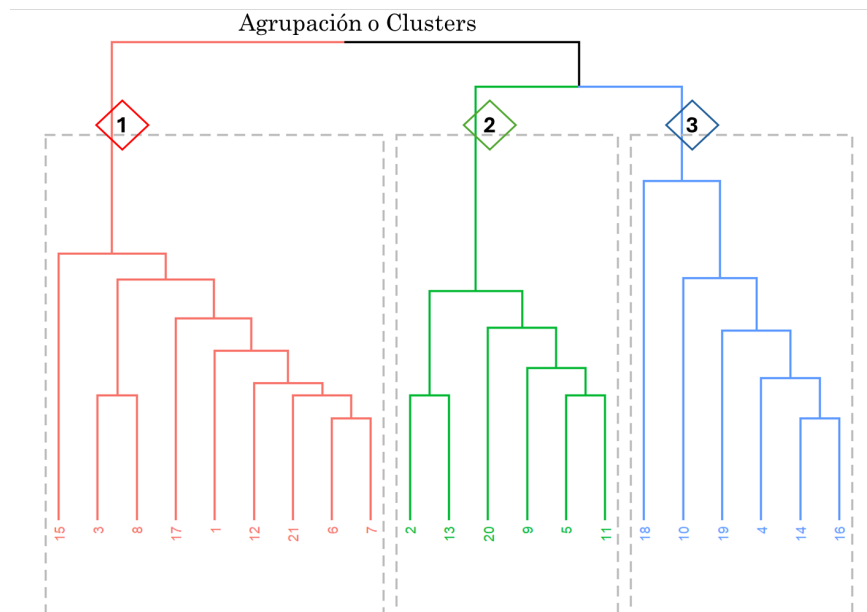


Figura 19| Representación de un dendrograma. El dendrograma muestra como el algoritmo de agrupación jerárquica distribuye los datos en tres clústeres distintos mediante la relación entre los puntos, etiquetados como 1 (color rojo), 2 (color verde) y 3 (color azul). Cada rama del dendrograma representa la similitud entre los elementos.

4.9.5. Análisis comparativo de clústeres en base a propiedades nutricionales y de clúster en base a capacidad Antioxidante

El objetivo conocer más sobre las matrices generadas mediante la agrupación por k-mean y agrupación jerárquica, se analizaron la existencia significativa en el poder antioxidante entre las frutas agrupadas según sus propiedades nutricionales, y viceversa, si existen diferencias significativas en las propiedades nutricionales entre las frutas agrupadas según su poder antioxidante.

Después de crear estos clústeres, se procedió a analizar las diferencias entre ellos desde dos perspectivas:

- **Análisis de las propiedades nutricionales en el clúster Antioxidante:** Se evaluó si las frutas, agrupadas según su poder antioxidante, presentaban diferencias significativas en sus propiedades nutricionales
- **Análisis del poder antioxidante en el clúster nutricional:** Se evaluó si las frutas, agrupadas en función de sus propiedades nutricionales, mostraban diferencias significativas en sus capacidades antioxidantes.

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico SPSS para determinar si existían diferencias significativas entre los clústeres generados para cada base de datos. Se compararon las medias mediante pruebas post hoc DMS (Duncan's Multiple Range Test) y Bonferroni.

4.10. Análisis estadístico

Se analizaron las correlaciones entre los clústeres mediante regresión múltiple utilizando IBM SPSS Statistics 29.0.2.0. Para comparar dos grupos, se realizaron prueba t no pareada, mientras que las diferencias entre tres o más grupos se determinaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Para comparar diferencias estadísticas entre dos grupos pareados, se utilizó la prueba de Wilcoxon.

En todas las pruebas estadísticas, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$, indicado con asteriscos (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq$

0,0001). Se emplearon los programas GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.) para los análisis estadísticos y FlowJo 10.8.1 (FlowJo LLC, Ashland, OR, EE. UU.) para realizar los análisis de citometría.

5. Resultados

Los resultados de esta investigación han sido desarrollados con el propósito de optimizar la obtención de compuestos fenólicos con capacidades antioxidante y buscar su potencial uso en áreas de interés comercial de la planta *S. dulcificum* mediante el producto comercial DMB®, hoja y semilla.

Con el fin de propiciar una alternativa segura, innovadora, sostenible, eficiente y automatizada en la obtención de compuestos fenólicos se evaluó los disolventes naturales eutécticos profundos (NaDES) mediante un grupo de fruta con interés comercial.

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, este capítulo se divide en cuatro secciones: DMB®, Semilla, Hoja y Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES). Cada sección detalla los resultados individuales.

5.1. DMB®: Pulpa de *Synsepalum dulcificum*

Mediante el uso de agua y etanol como disolventes, se llevaron a cabo las extracciones de compuestos fenólicos con el objetivo de evaluar la eficiencia de dichos disolventes en el proceso de extracción y determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos obtenidos.

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. La cantidad de flavonoides totales mediante la técnica con cloruro de aluminio, y la capacidad antioxidante mediante el porcentaje de inhibición al radical DPPH y equivalente a μmol trolox/ gramo de muestra seca.

5.1.1. Determinación de contenidos fenoles totales (CFT) de DMB®

Se obtuvieron compuestos fenólicos a partir de diferentes porcentajes de etanol como se observa en la **Figura 20**. Los valores máximos de CFT se obtuvieron con el solvente etanol al 70%, alcanzando 13 ± 1 mg GAE/g PS, con diferencias significativas al comparar con agua y concentración de 10%, 90% y 100% de etanol.

Para tener un diseño experimental con un espectro más amplio se realizó una estandarización aplicando tres parámetros diferentes: (1) porcentaje de etanol (2) tiempo de extracción (3) relación muestra/disolvente (p/v). Como se muestra en la **Figura 21**, los valores máximos de CFT se obtuvieron con etanol al 70%, relación 1:110 p/v y 0 horas de extracción, con $13,9 \pm 0,4$ mg GAE/ g PS. Sin embargo, las extracciones en estas condiciones no muestran diferencias significativas respecto a las obtenidas con etanol al 70 %, 1:10 p/v y 3 horas de extracción (13 ± 1 mg GAE/ g PS), o las resultantes de una extracción 1:50 p/v con etanol al 30%, 1, 2 y 3 horas de extracción y etanol al 70%, 0, 1, 2, 3 horas de extracción. Estas extracciones también se utilizaron para analizar capacidad antioxidante, resultados que se muestran en las siguientes secciones.

Los extractos obtenidos con una ratio de 1:110 p/v con etanol al 70% y 100% (**Figura 21 C**), no se han podido cuantificar por precipitaciones visibles.

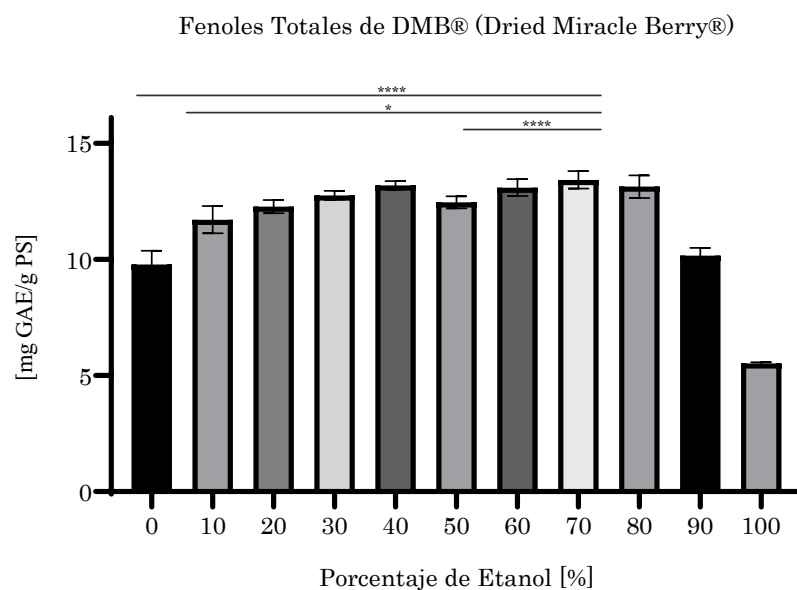


Figura 20 | Efecto de la concentración de etanol sobre el contenido de fenoles totales en DMB®. La figura representa el total de compuestos fenólicos obtenidos en el polvo liofilizado DMB® (pulpa + piel) con diferentes porcentajes de etanol. Los resultados se expresan en mg equivalente a ácido gálico por gramo de materia seca. El intervalo de confianza se representa mediante barras de error estándar, n=3. Se realizó un análisis de varianza mediante ANOVA de una vía para comparar los grupos, indicando diferencias significativas de las distintas condiciones frente al etanol 70 (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

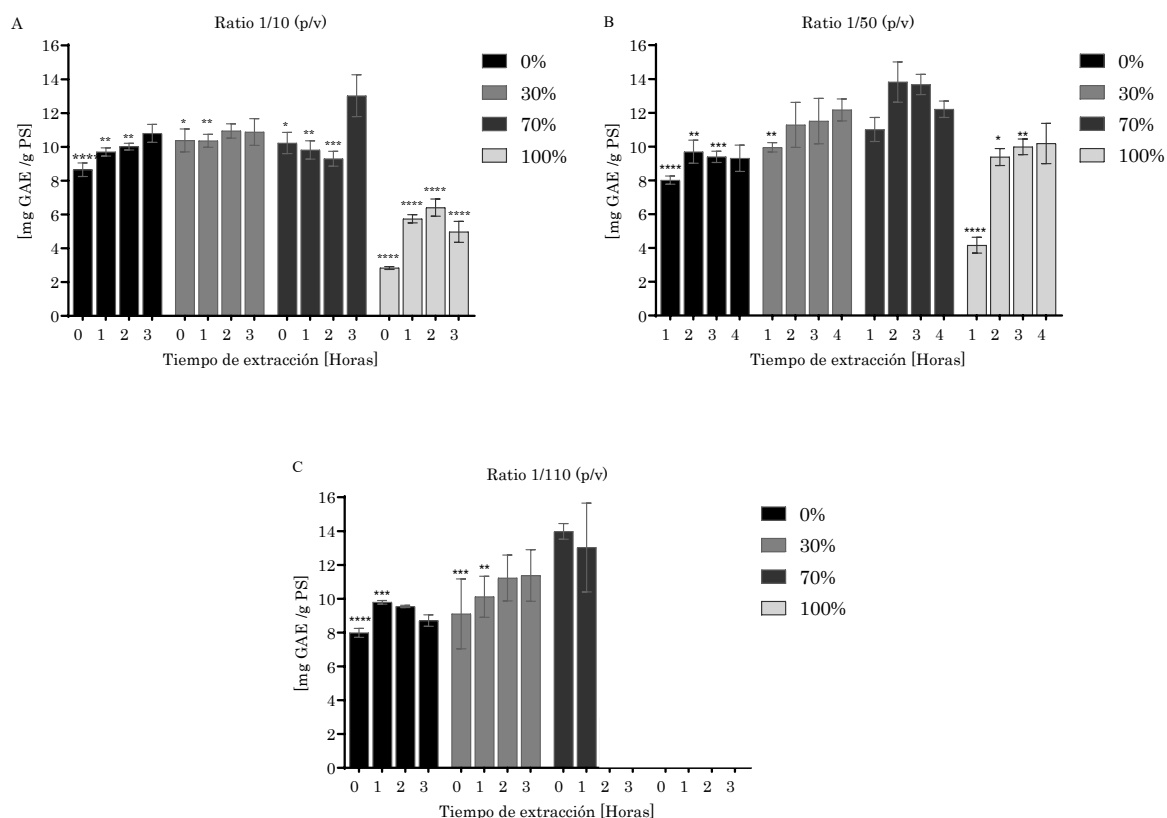


Figura 21 | Efecto de la concentración de etanol, tiempo de extracción y ratio muestra-disolvente en la obtención de compuestos fenólicos de DMB®. La figura representa el total de compuestos fenólicos obtenidos en el polvo liofilizado DMB® (pulpa + piel) con tres condiciones: Distintos tiempos de extracción 0 (vortex durante 10 segundos) 1, 2 y 3 horas con diferentes porcentajes de etanol, 0 (agua destilada), 30, 70, 100% y donde (A) indica los resultados en una relación peso/volumen de 1:10, (B) en una proporción de 1:50 peso/volumen y (C) 1:110 peso/volumen. Los resultados se expresan en mg equivalente a ácido gálico por gramo de muestra peso seco. El intervalo de confianza se representa con barras de error estándar, n=3. Las comparaciones entre los grupos se indican con asteriscos superíndice, marcando condiciones con diferencias estadísticamente significativas con relación a la condición 1:110 peso/volumen, etanol 70%, 0 horas (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001). Cada barra de los gráficos representa una condición específica, mostrando como las variables condicionan la obtención de los compuestos fenólicos.

5.1.2. Determinación de flavonoides totales de DMB®.

Los flavonoides, un tipo de fenoles con capacidad antioxidante, son de gran interés debido a su potencial bioactivo. Por esta razón, se procedió a la cuantificación de flavonoides totales en los extractos fenólicos obtenidos mediante el gradiente de etanol referenciado en la sección 5.1.1, página 90).

El valor máximo de flavonoides totales se obtuvo de manera significativa utilizando etanol al 80% como disolvente, alcanzando un valor de $8,45 \pm 0,47$ mg QE/g PS (Figura 22). En contraste, el agua fue el disolvente que presentó el menor contenido de flavonoides totales (Figura 22)

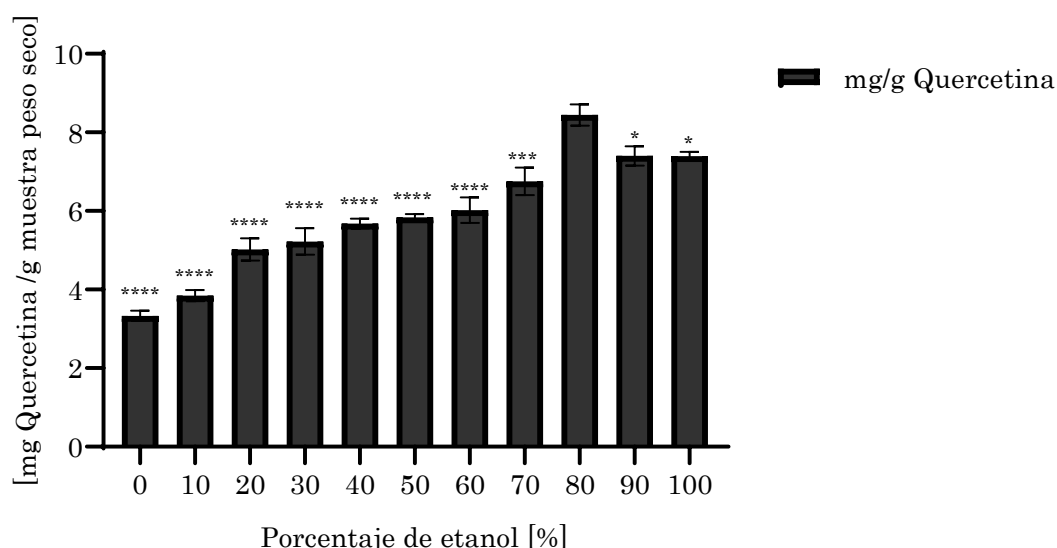


Figura 22 | Efecto de la concentración de etanol sobre el contenido de flavonoides totales en DMB®. El gráfico de barras muestra la cantidad de flavonoides de DMB® con distintos porcentajes de etanol, expresados en mg de quercetina por gramo de materia seca, con barras de error estándar (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas respecto al etanol al 80% se marcan con asteriscos según el valor de *p en un ANOVA de una vía (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001) con ANOVA de una vía.

5.1.3. Determinación capacidad antioxidante de DMB®.

Paralelamente a la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante gradiente de etanol, como se observa en la **Figura 23**. Los valores máximos de capacidad antioxidante se registraron con etanol al 70%, alcanzando 87 ± 5 μmol trolox/g PS, mostrados en el gráfico de barras, con inhibición al radical DPPH del 53% (curva de puntos en color rojo). Además, no se observaron diferencias significativas en los extractos obtenidos con concentraciones de etanol entre el 30% y el 60%.

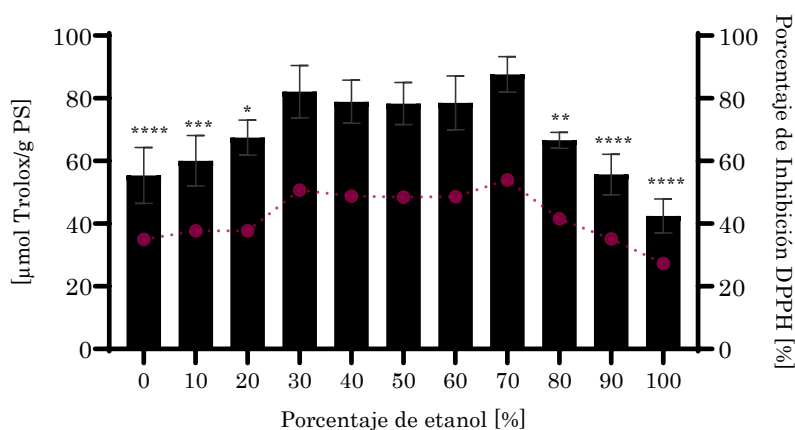


Figura 23 | Efecto de la concentración de etanol sobre la capacidad antioxidante de DMB® con el ensayo DPPH. El gráfico de barras presenta la capacidad antioxidante de DMB® con diferentes concentraciones de etanol, expresada en μmol equivalentes a trolox por gramo de materia seca, con barras de error estándar ($n=3$). Las diferencias significativas con respecto al etanol al 70% se indican con asteriscos tras un ANOVA de una vía (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). El gráfico de puntos rojos muestra el porcentaje de inhibición para cada condición evaluada.

Por otra parte, en los extractos fenólicos obtenidos mediante estandarización (considerando porcentaje de etanol, tiempo de extracción y relación disolvente-muestra), se registraron valores máximos bajo las condiciones de etanol al 70%, y una relación de 1:10 p/v, con un valor de 102 ± 8 μmol trolox/g PS independientemente del tiempo de extracción (**Figura 24 A**). No obstante, se evidenciaron diferencias significativas en las demás condiciones estudiadas, como

se observa en el gráfico de la relación 1:50 p/v (**Figura 24 B**) y 1:110 p/v (**Figura 24 C**), en las cuales los valores no superaron los 80 μmol trolox/g PS.

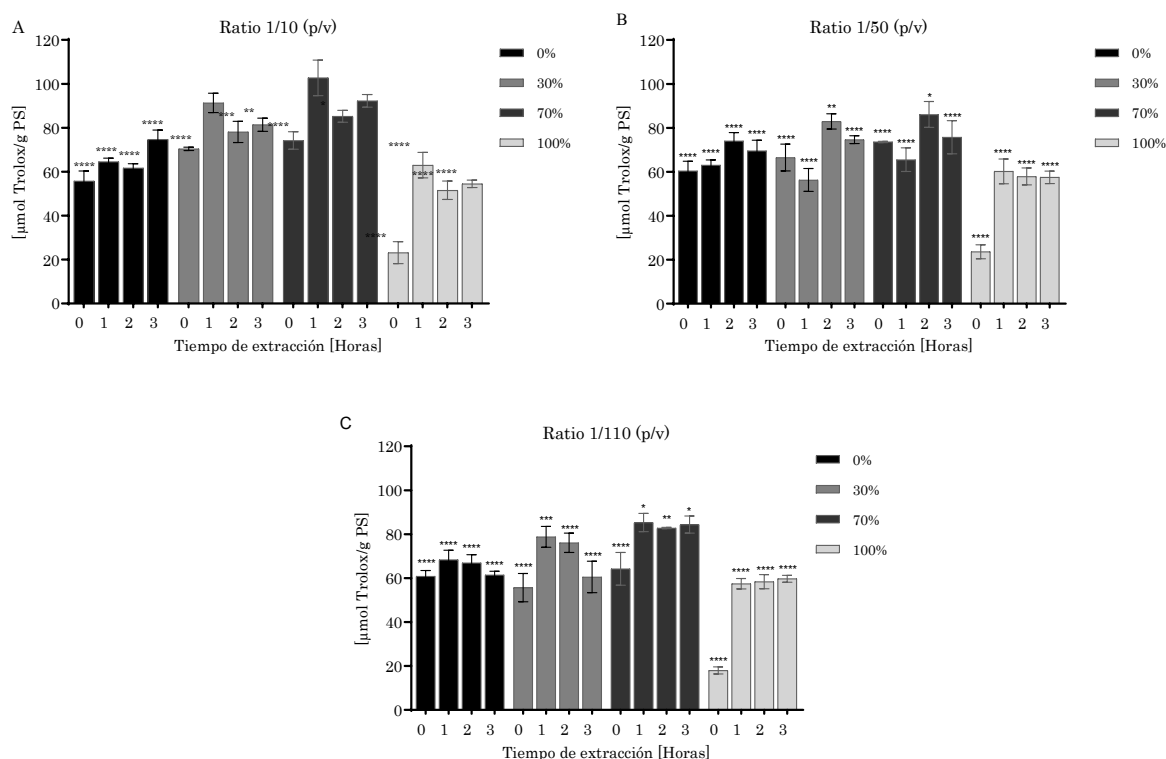


Figura 24 | Efecto de la concentración de etanol, tiempo y relación muestra-disolvente sobre la capacidad antioxidante de DMB®. Los resultados, expresados en μmol de trolox por gramo de materia seca, evalúan la capacidad antioxidante del polvo liofilizado DMB® (pulpa + piel) extraído con distintas concentraciones de etanol y tiempos de extracción. Las etiquetas (A, B y C) indican diferentes relaciones p/v y se empleó el ensayo DPPH. Se muestran barras de error estándar ($n=3$) y las diferencias significativas frente a la extracción estándar se marcan con asteriscos según el valor de $*p$ ($*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$).

5.1.4. Comparación de DMB® con otras frutas.

i. Compuestos fenólicos totales

Con el fin de comparar DMB® con otras frutas y evaluar su potencial en función de su contenido de compuestos fenólicos, se realizaron extracciones de compuestos fenólicos de ciruela y paraguayá. La ciruela fue seleccionada como control positivo debido a su conocida alta concentración de compuestos fenólicos, característica que

favorece su uso comercial. Por otro lado, la paraguaya se utilizó como control negativo, dado su bajo contenido en dichos compuestos.

En **Figura 25**, el gráfico de barras muestra que el extracto de DMB® contiene una cantidad significativamente mayor de compuestos fenólicos en comparación con el extracto de ciruela (curva de puntos en color rojo), alcanzando hasta un 34% más de fenoles totales al emplear etanol al 80% como disolvente. Por otro lado, al analizar el control negativo (paraguaya), los valores de compuestos fenólicos extraídos no superan los 3 mg GAE/g PS en ninguna de las condiciones evaluadas (curva en color café), lo que refleja una baja concentración de fenoles en dicho control bajo las mismas condiciones experimentales.

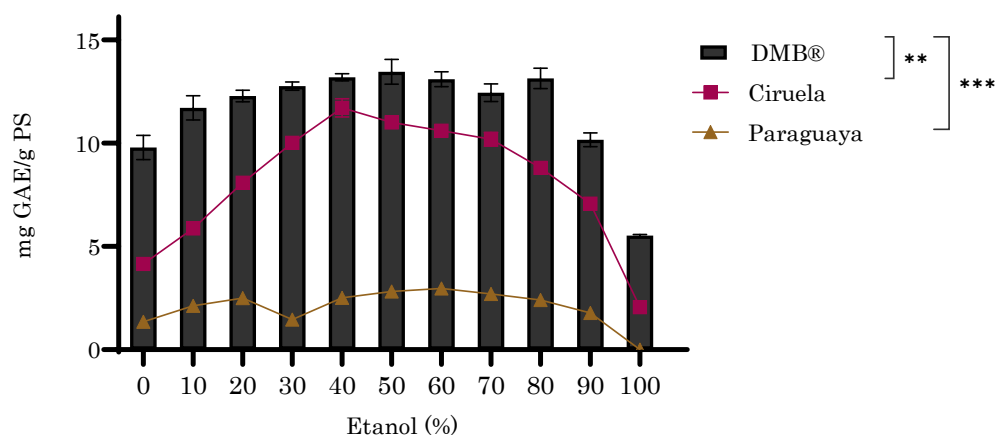


Figura 25 | Comparación de los fenoles totales de diferentes frutas con respecto a DMB®.

Los gráficos de puntos muestran el total de compuestos fenólicos en ciruela (rojo) y paraguaya (café). El gráfico de barras corresponde a DMB®. Los resultados están expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca, con barras de error estándar (n=3) y diferencias significativas entre los grupos indicadas por asteriscos según un ANOVA de una vía (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001).

Además, se cuantificaron los flavonoides totales presentes en los extractos de ciruela y paraguaya. Los resultados indicaron que la ciruela presenta una alta concentración de flavonoides. Como se muestra en **Figura 26**, la mayor cantidad de flavonoides se obtuvieron en el extracto de ciruela, alcanzando un valor de $9,87 \pm 0,45$ mg QE/g PS cuando se utilizó etanol al 40% como disolvente. En contraste, los

valores obtenidos para el control negativo (paraguaya) no superaron los 4 mg QE/g PS en ninguna de las condiciones evaluadas, lo que refleja una menor concentración de flavonoides en este caso.

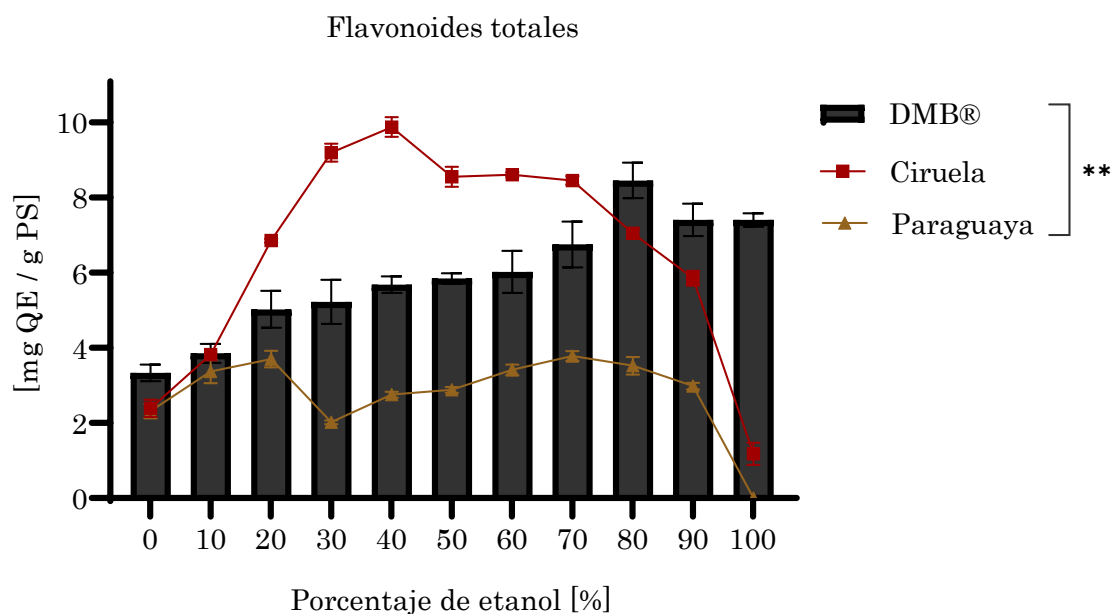


Figura 26 | Comparación de los flavonoides totales de diferentes frutas con respecto a DMB®. Los gráficos de puntos representan el total de flavonoides obtenidos de ciruela (color rojo) y paraguaya (color café), mientras que el gráfico de barras muestra los resultados para DMB®. Todos los resultados se expresan en miligramos equivalentes a quercetina por gramo de materia seca. Las barras de error estándar indican el intervalo de confianza, n=3. Las comparaciones entre los grupos se señalan con asteriscos superíndices, indicando condiciones con diferencias estadísticamente significativas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$), determinadas mediante ANOVA de una vía.

Con el propósito de evaluar el potencial antioxidante de DMB® y su viabilidad como fruta con propiedades antioxidantes. De forma preliminar, se comparó su potencial con diferentes frutas. Se seleccionaron condiciones de extracción previamente optimizadas, determinando que el uso de etanol al 70% como solvente, un tiempo de extracción de 1 hora y una proporción de 1:10 p/v ofrecían la mayor eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos. Estos parámetros, que resultaron en la inhibición máxima del radical DPPH, se eligieron tras comprobar

que bajo estas condiciones se alcanzaron los valores más altos de capacidad antioxidante en el extracto de DMB®.

La **Figura 27**, se presentan los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante, expresada en $\mu\text{mol trolox/g PS}$, de los extractos analizados. Bajo las condiciones experimentales estudiadas, se observa que los compuestos obtenidos de DMB® (barra delineada en rojo) muestran una capacidad antioxidante superior en comparación con la mayoría de las frutas analizadas como por ejemplo arándano, fresa, uva, ciruela. Lo que sugieren que los compuestos obtenidos con el disolvente etanol de DMB® poseen una elevada actividad antioxidante, lo que podría ser de interés para el desarrollo de productos con propiedades funcionales. Por otro lado, al comparar con las frutas açai, fresa, guaraná y maqui estos superan a DMB®.

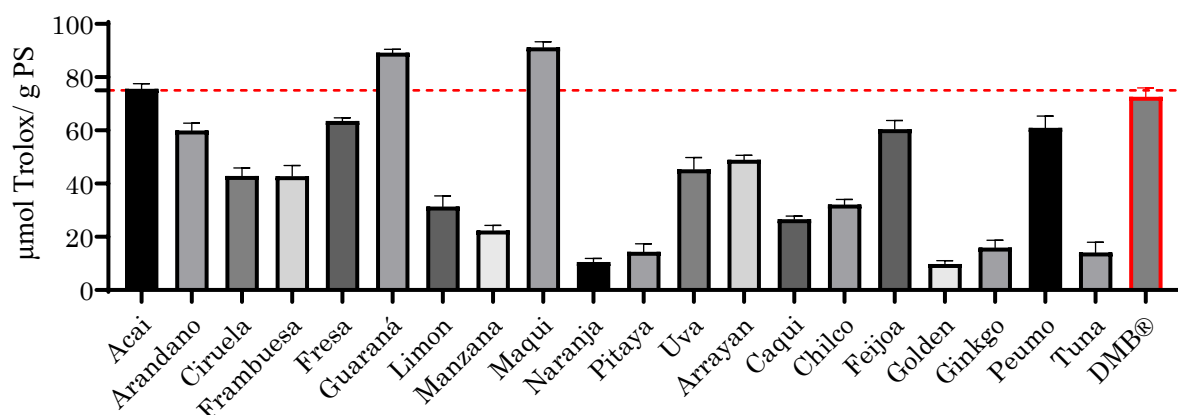


Figura 27 | Comparación del porcentaje de inhibición al radical DPPH de diferentes frutas con respecto a DMB®. Los gráficos de barra muestran la capacidad antioxidante medida en μmol de trolox por gramo de materia seca, mientras que la gráfica de puntos representa el porcentaje de inhibición del radical DPPH para cada tipo de fruta. En ambos gráficos, el intervalo de confianza se representa mediante barras de error estándar, $n=2$. Las diferencias significativas con relación a DMB® se indican con asteriscos superíndice, indicando niveles de significancia estadística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) determinadas mediante ANOVA de dos vías.

5.1.5. Determinación de fenoles de DMB® mediante HPLC.

Con el objetivo de identificar algunos de los compuestos presentes en DMB® y evaluar la influencia del disolvente en la extracción de dichos compuestos, se analizaron los extractos fenólicos de DMB® obtenidos con agua, etanol al 50%, 70% y 100% mediante HPLC. Estos extractos fueron comparados con estándares de compuestos fenólicos comerciales puros presentes en los extractos de DMB®.

El perfil fenólico de los extractos, detallado en la **Tabla 8**, y expresado en μg de compuesto fenólico por gramo de materia seca, muestra que los extractos acuosos contienen las concentraciones más altas de los compuestos evaluados. Destacan el ácido protocatecúico (PA) con $771,5 \pm 2,8 \mu\text{g/g PS}$, seguido por ácido gálico con $174,0 \pm 0,7 \mu\text{g/g PS}$ y catequina con $145,3 \pm 1,2 \mu\text{g/g PS}$. Por otro lado, se observan los compuestos con menores concentraciones, rutina (RU) con $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g/g PS}$, ácido cinámico con $0,55 \pm 0,01 \mu\text{g/g PS}$ y ácido cafeico con $0,375 \pm 0,05 \mu\text{g/g PS}$ independientemente del disolvente empleado.

Para representar la influencia de los disolventes en la concentración de los compuestos extraídos, se graficaron las concentraciones de cada compuesto según el disolvente empleado (**Figura 28**). Los compuestos están ordenados por tiempo de retención (TR) de menor a mayor. Los colores en los gráficos indican cuál disolvente es más efectivo para cada compuesto: el azul representa los compuestos extraídos en mayor concentración con disolvente acuoso, destacando el ácido gálico, protocatequico y catequina; el verde corresponde a los compuestos mejor extraídos con diluciones hidroetanólicas; y el rojo señala aquellos obtenidos con altas concentraciones de etanol. Además, en cada gráfico se muestra la concentración específica de cada compuesto según el disolvente utilizado.

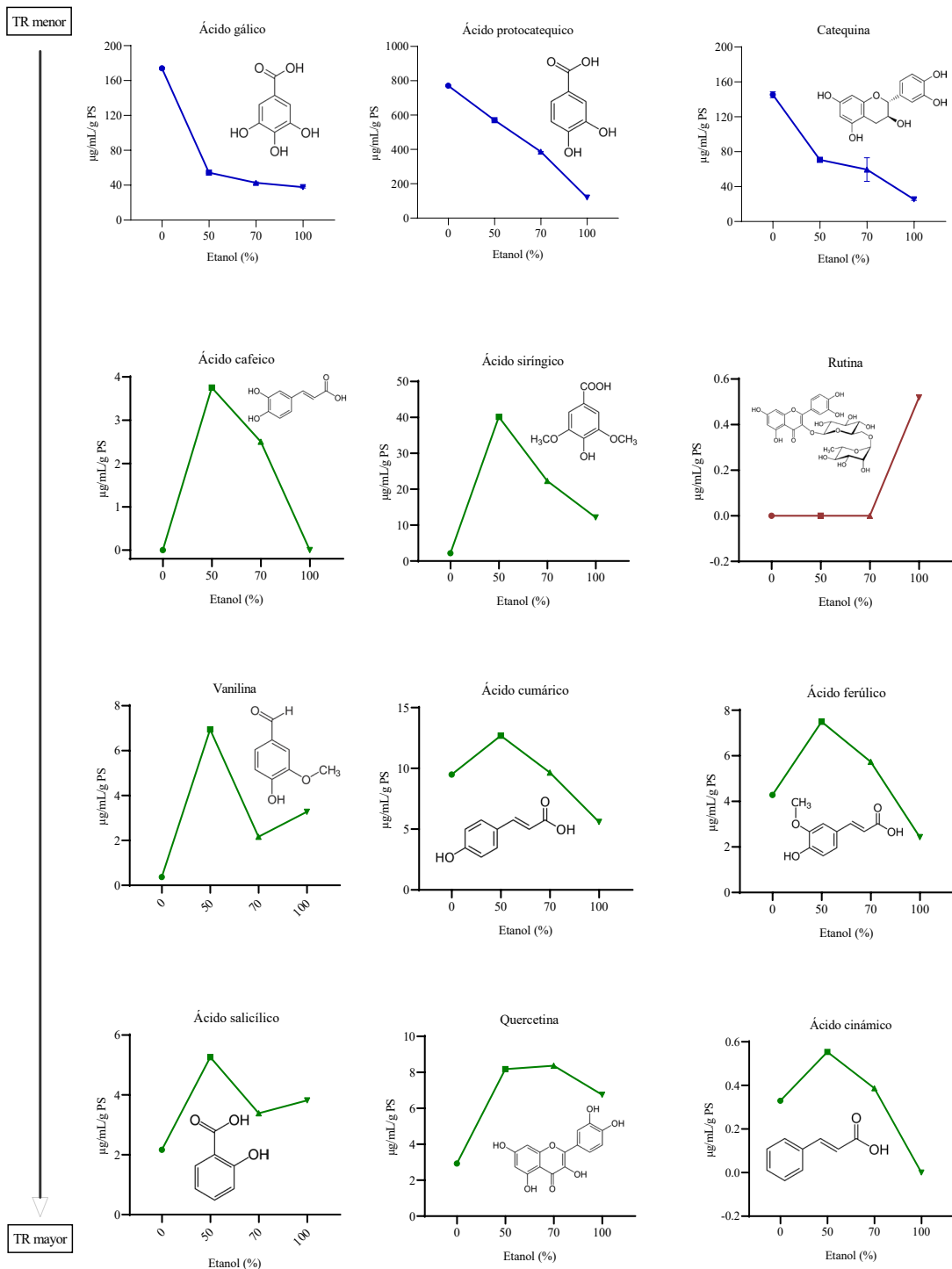


Figura 28 | Estructura química y el comportamiento de los compuestos identificados mediante HPLC en extracto DMB®. Cada grafico representa la concentración de un compuesto en función del disolvente utilizado. RT= tiempo de retención analizado mediante HPLC.

Tabla 8 | Perfil fenólico identificado en extractos de DMB® mediante HPLC.

Compuestos fenólicos	Tiempo de retención (min)	Curva estandar	Coeficiente de correlación (r^2)	Cantidad (mg/g Peso Seco)			
				0 % EtOH	50 % EtOH	70 % EtOH	100 % EtOH
Ácido gálico (AG)	5.4	$y = 81204x - 5990.7$	$R^2 = 0.9997$	174.0±0.7	54.5±0.4	42.8±0.6	37.7±0.5
Ácido protocatecúico (AP)	8.6	$y = 79926x + 4177.5$	$R^2 = 0.9997$	771±2	570.7±0.8	386.6±0.6	119.5±0.2
Catequina (CAT)	10.2	$y = 17879x - 720.19$	$R^2 = 0.9997$	145±2	70.8±0.3	70±9	25.4±0.7
Ácido cafeico (ACaf)	12.3	$y = 226602x + 71781$	$R^2 = 0.9986$	0	3.75±0.05	2.5±0.1	0
Ácido siríngico (ASyr)	12.6	$y = 201622x - 26650$	$R^2 = 0.9997$	2.17±0.01	40.1±0.4	22.2±0.3	12.1±0.2
Rutina (RUT)	16.21	$y = 48622x + 2371.2$	$R^2 = 0.9997$	0	0	0	0.5±0.1
Vanilina (VAN)	17.2	$y = 151301x - 581.47$	$R^2 = 0.9998$	0.36±0.02	6.9±0.1	2.16±0.08	3.2±0.2
Ácido cumárico (AC)	17.9	$y = 184250x + 10032$	$R^2 = 0.9997$	9.49±0.07	12.70±0.01	9.6±0.1	5.58±0.05
Ácido ferúlico (AF)	18.8	$y = 155525x + 1518.5$	$R^2 = 0.9998$	4.3±0.2	7.49±0.04	5.73±0.06	2.42±0.01
Ácido salicílico (AS)	22.9	$y = 24793x - 1560.2$	$R^2 = 0.9997$	2.7±0.2	5.26±0.02	3.4±0.2	3.8±0.2
Quercetina (QUER)	25.7	$y = 91777x - 15882$	$R^2 = 0.9996$	2.92±0.01	8.17±0.03	8.36±0.03	6.7±0.1
Ácido cinámico (ACin)	27.3	$y = 234241x + 2259.8$	$R^2 = 0.9998$	0.32±0.05	0.55±0.01	0.38±0.01	0

5.1.6. Identificación de compuestos de DMB® mediante CG-MS.

Para profundizar en el análisis de los compuestos presentes en DMB®, se realizaron análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Dado que el número de muestras debía limitarse para esta técnica, se seleccionaron los extractos obtenidos con agua como disolvente, ya que en estudios previos este disolvente mostró la mayor cantidad de compuestos y, además, fue el utilizado en los ensayos celulares. Los compuestos identificados fueron comparados con las bases de datos de espectros de masas (NIST) confirmando la identidad.

En la **Tabla 9**, se presentan los compuestos identificados, ordenados según su tiempo de retención (TR) de menor a mayor. Se incluye, además, su fórmula molecular y su identificador alfanumérico (InChIKey). En el análisis, se obtuvieron tres posibles compuestos para un mismo tiempo de retención, lo que sugiere la presencia de isómeros o compuestos con estructuras químicas similares.

Estos compuestos pertenecen a diferentes categorías químicas, por ejemplo:

- **Alcoholes:** Se identificaron compuestos como la glicerina y el 2-furanmetanol, conocidos por sus propiedades como disolventes y agentes humectantes.

- **Ésteres:** Se detectaron ésteres como el ácido 2-oxopropanoico y el ácido hexadecanoico, que son importantes en la síntesis de polímeros y en la industria alimentaria.
- **Compuestos furánicos:** Se encontraron compuestos como la 2,4-dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona y el 5-hidroximetilfurfural, que son relevantes en la formación de sabores y aromas en productos alimenticios.
- **Lactonas:** La 2-oxepanona, 7-hexil-, es un ejemplo de lactona identificada, compuestos que contribuyen al aroma de muchos alimentos.
- **Carbohidratos:** Se identificaron azúcares como la melezitosa y la lactosa, que son importantes en la industria alimentaria y farmacéutica.
- **Ácidos grasos:** Se encontraron ácidos grasos como el ácido octadecanoico y el ácido hexadecanoico, 2-hidroxil-1-(hidroximetil) etil éster, que son fundamentales en la estructura y función de las membranas celulares.

Tabla 9 | Compuestos identificados en extracto acuoso de DMB® mediante GC-MS.

Pico	Tiempo de retención	Opción 1	Formula molecular	InChIKey	Opción 2	Formula molecular	InChIKey	Opción 3	Formula molecular	InChIKey
1	5,14	Glicerina	C3H8O3	PEDCQBHI- VMGVHV- UHFFFAOY SA-N	3-Metoxi-2,2-dimetiloxirano	C5H10O2	FPKWGRVM- LLIFS- UHFFFAOYS A-N	p-Dioxano-2,3-diol	C4H8O4	YLVACWCC- JCZITJ- UHFFFAOY SA-N
2	6	Ácido propanoico, 2-oxo-, éster metílico	C4H6O3	CWKLZLBV- OJRSOM- UHFFFAOY SA-N	3-Amino-2-oxazolidinona	C3H6N2O2	KYCJNUIHW- NJNCT- UHFFFAOYS A-N	Acetoxicarbamato de etilo	C5H9NO4	PWDCNDKC- DGS DGY- UHFFFAOY SA-N
3	7,27	2-Furanmetanol	C5H6O2	XPFVYQJU- AUNWIW- UHFFFAOY SA-N	3-Furanmetanol	C5H6O2	STJIISDMSM- JQQK- UHFFFAOYS A-N	Ácido metilenciclopropanocarboxílico	C5H6O2	QJUQASYV- MKRUMN- UHFFFAOY SA-N
4	9,38	2,4-Dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona	C6H8O4	JYMIRUWY- SKOKRU- UHFFFAOY SA-N	4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	C6H8O4	JYMIRUWYS- KOKRU- UHFFFAOYS A-N	N-(1-Metoxicarbonil-1-metiletil)-4-metil-2-azal,3-dioxano	C9H17NO4	VWGVVWVK- WTUQAIE- UHFFFAOY SA-N
5	10,65	2,5-Dimetilfuran-3,4(2H,5H)-diona	C6H8O3	PVDDHUF- FRRFMN- UHFFFAOY SA-N	Furaneol	C6H8O3	INAXVBDK- KUCGI- UHFFFAOYS A-N	2,5-Piperazinodiona, 3-metil-	C5H8N2O2	ICCHEGCKV- BMSTF- UHFFFAOY SA-N
6	11,94	4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	C6H8O4	VOLMSPGW- NYJHQ- UHFFFAOY SA-N	2,4-Dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona	C6H8O4	JYMIRUWYS- KOKRU- UHFFFAOYS A-N	2-Propiltetrahidropirano-3-ol	C8H16O2	SMMPBJGN- KCWQPY- UHFFFAOY SA-N
7	12,96	5-Hidroxi metilfurfural	C6H6O3	NOEGNKM- FWQHSLB- UHFFFAOY SA-N	Furano, 2,3-dihidro-4-(1-metilpropil)-, (S)-	C8H14O	UQEZSQDDL- ZCNRH- ZETCQYMHS A-N	4-Mercaptofenol	C6H6OS	BXAVKNRW- VKUTLY- UHFFFAOY SA-N
8	13,36	2-Oxepanona, 7-hexilo-	C12H22O2	FRTMRFCN- TDDSOB- UHFFFAOY SA-N	Caprolactama	C6H11NO	JBKVHLHDH- HXQE- UHFFFAOYS A-N	2-Oxepanona, 7-butilo-	C10H18O2	YKVIWISPF- DZYOW- UHFFFAOY SA-N
9	13,69	Octanamida, N-(2-mercaptoetil)-	C10H21NO	JLZORHOC- SVVPH- UHFFFAOY SA-N	Maltosa	C12H22O11	GUBGYTABK- SRVRQ- QUYVBRFLS A-N	6-Oxoheptanoato de metilo	C8H14O3	BSBYQAYW- PXHLFQ- UHFFFAOY SA-N
10	15,67	Melezitosa	C18H32O16	QWIZNVHX- ZXRPRD- WSCXOGST SA-N	Maltosa	C12H22O11	GUBGYTABK- SRVRQ- QUYVBRFLS A-N	Lactosa	C12H22O11	GUBGYTAB- KSRVRQ- DCSYEGIMS A-N
11	16,42	2,6-Diamino-4-ciclohexil-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo	C13H16N4S	RBAOYVGX- TOUWKG- UHFFFAOY SA-N	Ciclohexano, 1,4-dimetil-2-octadecil-	C26H52	IYAUESUIH- MJWPO- UHFFFAOYS A-N	Octa-2,6-dieno, 2,7-dimetil-4-feniltio-	C16H22S	OTLKSJYKR- HNQQB- UHFFFAOY SA-N
12	19,82	Ácido hexadecanoico, éster metílico	C17H34O2	FLIACVVOZ- YBSBS- UHFFFAOY SA-N	Ácido pentadecanoico, 13-metil-, éster metílico	C17H34O2	FRGDZXRZD- AJTOU- UHFFFAOYS A-N	Ácido pentadecanoico, 14-metil-, éster metílico	C17H34O2	WAKCWJND- XBPEBP- UHFFFAOY SA-N
13	20,11	1-(+)-Ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato	C38H68O8	TUYRNAGG- LJZRNM- LBHUVFDK SA-N	Ácido n-hexadecanoico	C16H32O2	IPCSVZSSVZ- VIGE- UHFFFAOYS A-N	Ácido pentadecanoico	C15H30O2	WQEPLUUG- TLDZJY- UHFFFAOY SA-N
14	21,68	Ácido octadecanoico	C18H36O2	QIQXTHQID- YTFRH- UHFFFAOY SA-N	Ácido octadecanoico, 2-(2-hidroxi etoxi)etil éster	C22H44O4	PWVUXRBU- UYZMKM- UHFFFAOYS A-N	Ácido L-ascórbico, 6-octadecanoato	C24H42O7	LITUBCVUX- PBCGA- WMZHIEFX SA-N
15	24,26	Ácido hexadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil éster	C19H38O4	BBNYCLAR- EVXOSG- UHFFFAOY SA-N	Glicerol 1-palmitato	C19H38O4	QHZLMUACJ- MDIAE- UHFFFAOYS A-N	Ácido hexadecanoico, 1-(hidroximetil)-1,2-etano di éster	C35H68O5	JEJLGIQLP- YYGEE- UHFFFAOY SA-N

5.1.7. Efecto anticancerígeno de DMB®.

- i. **Obtención de la concentración media inhibitoria (CI50) de cáncer colorrectal expuestos a extracto de DMB®.**

Con el fin de evaluar los posibles efectos anticancerígenos de DMB® en el cáncer colorrectal, se trataron las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW480 y SW620, correspondientes a cáncer colorrectal, con extracto de DMB®. En primer lugar, se determinó la concentración inhibitoria media (CI50), lo que permitió evaluar la eficacia del extracto en la inhibición de la proliferación celular. Este parámetro, que facilita la comparación de la potencia del extracto de DMB® con tratamientos anticancerígenos convencionales, se obtuvo también para los extractos de semilla y hoja, cuyos resultados se presentan más adelante.

Como se observa en la **Figura 29**, los extractos disminuyeron la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis; a mayor concentración de extracto administrado, menor fue el porcentaje de células viables, observándose una tendencia similar en las cuatro líneas celulares. Los valores de CI50 fueron de $12,3 \pm 0,4$, $12,5 \pm 0,4$, $12,9 \pm 0,4$ y $11 \pm 0,4$ mg/mL para las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW480 y SW620, respectivamente.

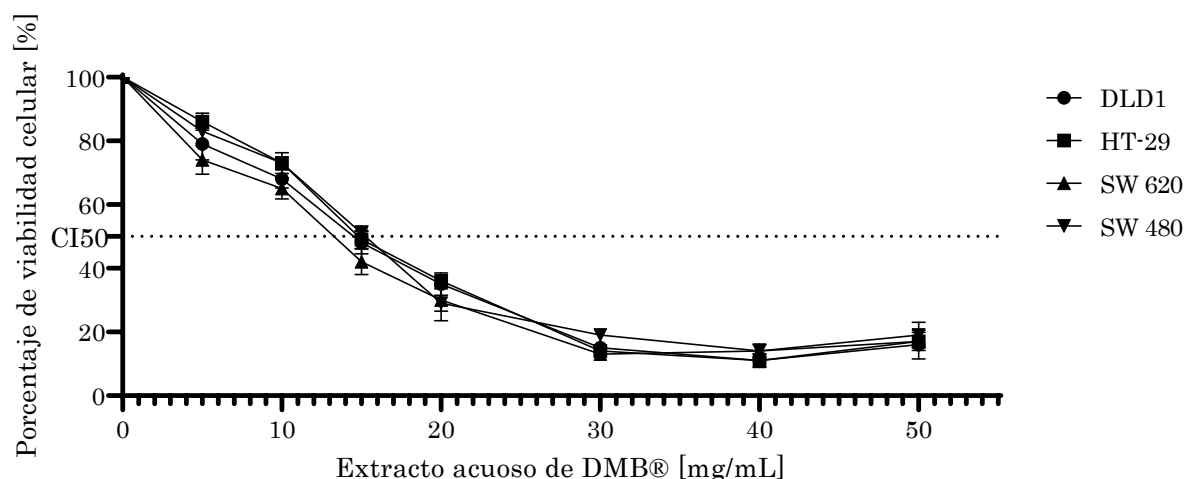


Figura 29 | Valores CI50 de líneas celulares de cáncer colorrectal frente a extracto acuoso proveniente de DMB®. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=3). Los valores de CI50 se calcularon con GraphPad Prism. Se realizaron 3 ensayos independiente, con 4 réplicas técnicas cada uno

ii. Citotoxicidad aguda en cáncer colorrectal mediante DMB®.

Con el objetivo de mejorar la eficacia del tratamiento con oxaliplatino, se evaluó el efecto del extracto de DMB® en combinación con oxaliplatino en líneas celulares de cáncer colorrectal. Para ello, las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW480 y SW620 fueron tratadas con concentraciones crecientes de oxaliplatino (0, 0,040, 0,097, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con una concentración fija de 7 mg/mL de extracto de DMB®, ya que concentraciones superiores de este último resultaron en muerte celular total..

Se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en las líneas DLD-1 y SW620 tratadas con la combinación de DMB® y oxaliplatino, en comparación con las células tratadas solo con oxaliplatino, con reducciones del 77% y 29%, respectivamente (**Figura 30A** y **Figura 30C**). No obstante, en las líneas HT-29 y SW480 no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (**Figura 30B** y **Figura 30D**). Los valores de CI50 se detallan en la **Tabla 10**, donde se presentan los CI50 y los logaritmos de CI50.

Tabla 10 | CI50 en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxaliplatino y oxaliplatino con DMB® en líneas celulares de cáncer colorrectal DLD-1, HT-29, SW480 y SW620.

	DLD-1		HT-29		SW620		SW480	
	Oxaliplatino	Oxaliplatino +DMB®	Oxaliplatino	Oxaliplatino +DMB®	Oxaliplatino	Oxaliplatino +DMB®	Oxaliplatino	Oxaliplatino +DMB®
CI50	56,79	13,04	13,62	24,97	6,225	4,365	8,628	10,48
logCI50	1,754	1,115	1,134	1,397	0,7941	0,64	0,9359	1,02

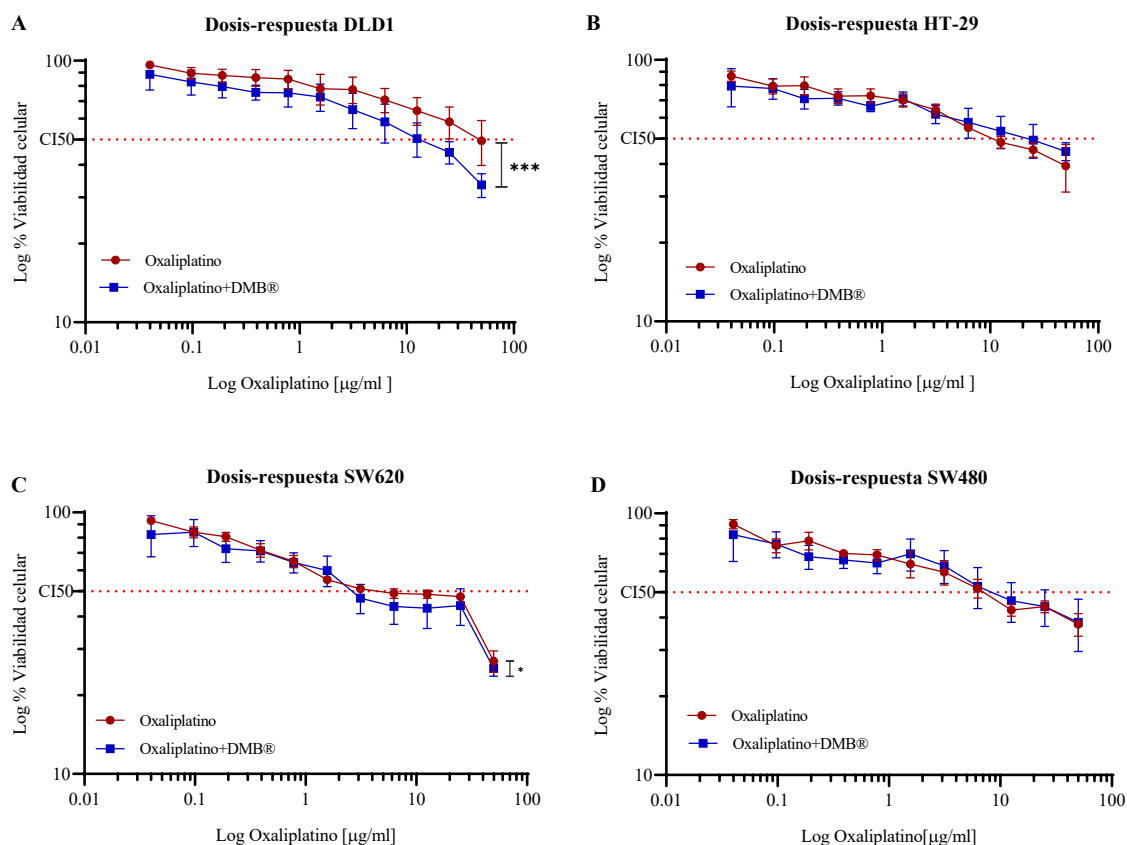


Figura 30 | Viabilidad celular de líneas celulares de cáncer colorrectal frente oxaliplatino y DMB®. La viabilidad celular del cáncer colorrectal se evaluó mediante la exposición a 11 concentraciones de oxaliplatino junto con una dosis constante de extracto acuoso de DMB®. (A) DLD-1, (B) HT-29, (C) SW620 y (D) SW480. Se empleó DMEM suplementado como control negativo. Los resultados incluyen barras de error estándar, y las diferencias significativas respecto a DMB® se indicaron con asteriscos, (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) utilizando la prueba de Wilcoxon. Se realizaron tres ensayos independientes, con cuatro réplicas cada uno.

iii. Citotoxicidad crónica en cáncer colorrectal mediante DMB®

Con el fin de evaluar la posible resistencia o sensibilidad celular al extracto de DMB®, las células metastásicas SW620 fueron expuestas durante 59 días a una concentración de 0,811 mg/mL (equivalente al CI3) de extracto de DMB®. Como se mencionó previamente, concentraciones superiores al CI3 provocaron la muerte celular a los 7 días. La línea celular SW620 fue seleccionada por su relevancia en

estudios de cáncer colorrectal metastásico, lo que la convierte en un modelo adecuado para el estudio de migración celular. Estos parámetros se mantuvieron en el ensayo de cronicidad con los extractos de semilla y hoja, cuyos resultados se presentan más adelante.

En la **Figura 31**, se observa que la curva correspondiente a las células tratadas con DMB® (curva de color rosa) se sitúa generalmente por debajo de la curva de las células control (color gris). Esto sugiere que el tratamiento con el extracto de DMB® ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación de las células metastásicas SW620, indicando una mayor sensibilidad celular al tratamiento.

Para comprobar la sensibilidad celular de las células tratadas, se realizaron ensayo de dosis-respuesta en combinación con el quimioterapéutico oxaliplatino en las células control y en las células tratadas. Los valores se determinaron mediante el ensayo MTT después de 72 horas de exposición a once concentraciones distintas de oxaliplatino (0, 0,040, 0,097, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/mL). Como control negativo se empleó medio de cultivo DMEM suplementado.

En la **Figura 32**, se observa un efecto similar entre el quimiofármaco oxaliplatino sobre las células tratadas con DMB® (curva azul) y las células control (curva roja). Sin embargo, a concentraciones más elevadas (recuadro verde), se aprecia una disminución del crecimiento celular de hasta un 10% en las células previamente tratadas con DMB®, en comparación con aquellas que no fueron expuestas al tratamiento con el extracto. Las células viables a estas concentraciones suelen ser las resistentes al quimiofármaco.

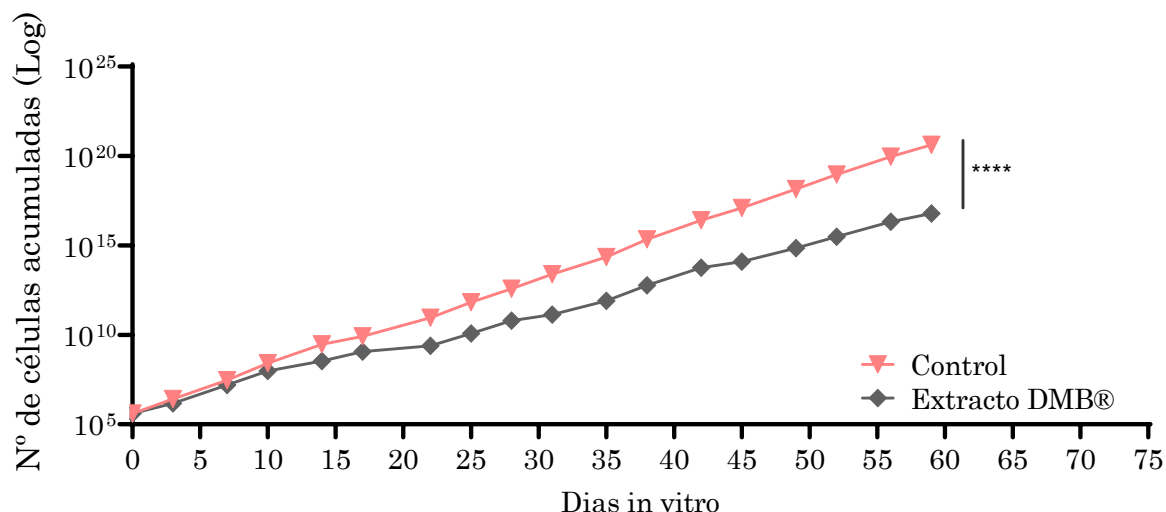


Figura 31 | Curva de crecimiento de la línea celular SW620 en presencia de extracto de DMB®. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=2). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001) determinadas mediante la prueba de Wilcoxon.

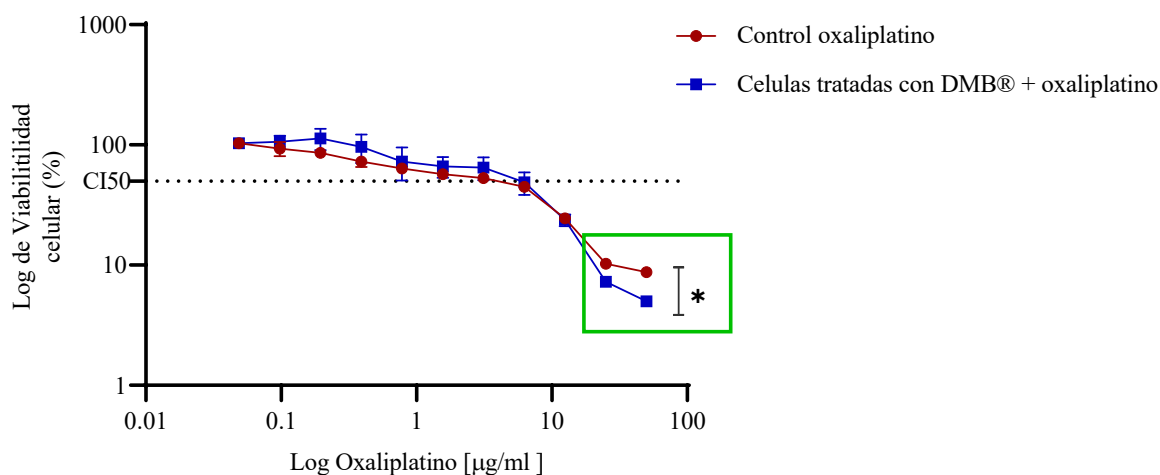


Figura 32 | Dosis-respuestas a oxaliplatino de línea metastásica SW620 tratadas con extracto acuoso de DMB® de manera crónica. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=3). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001) determinadas mediante la prueba de Wilcoxon.

5.1.8. Efecto inmunomodulador de DMB®

Se trataron los linfocitos con extracto acuoso de DMB® para evaluar una posible activación del sistema inmunitario, ya que se ha reportado que varios tipos de frutas tienen esta peculiaridad (Mishra et al., 2022).

El análisis preliminar de citometría de flujo muestra que el tratamiento con extracto de DMB® durante 48 horas a diferentes concentraciones (0, 10, 20 y 100 µg/mL) induce un incremento en las poblaciones totales de células T (CD3), así como en las subpoblaciones de células T auxiliares (CD4) y células T citotóxicas (CD8). Sin embargo, la población de células B, no muestra cambios.

La **Figura 33**, representa la distribución de la expresión de los marcadores celulares CD3, CD4, CD8, y CD19 en diferentes condiciones de tratamiento, control en color verde, 10 µg/mL en azul, 20 µg/mL en rojo, y 100 µg/mL en naranja. En los perfiles de histogramas, el eje X representa la intensidad de fluorescencia, mientras que el eje Y muestra el número de células (Count) que exhiben esas intensidades. Se observa un desplazamiento hacia la derecha en las curvas a medida que aumenta la concentración del tratamiento, lo que indica un incremento en la expresión de los marcadores estudiados conforme se incrementa la dosis del tratamiento. Este aumento en la expresión puede estar relacionado con la activación celular, ya que marcadores como CD3, CD4, CD8 y CD19 están asociados con la activación y proliferación de células inmunitarias. Por otro lado, las células B (CD19) son responsables de la producción de anticuerpos no muestra cambios.

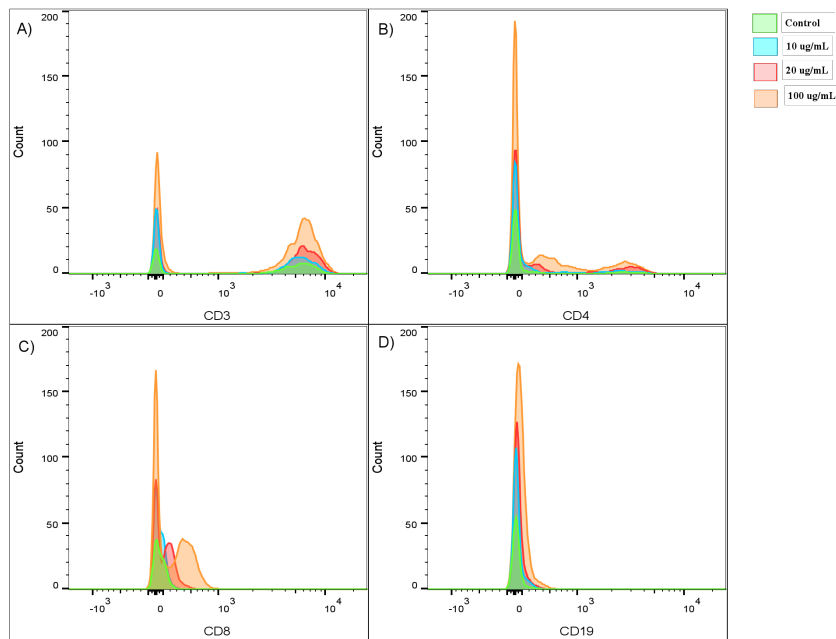


Figura 33 | Expresión de biomarcadores linfocitario tras exposición DMB®.
Representación de los perfiles de histograma de las frecuencias del fenotipo celular con relación a la expresión de biomarcadores

5.1.9. Actividad aglutinante del extracto DMB®

Con el objetivo de corroborar la seguridad alimentaria del extracto de DMB®. Se trataron eritrocitos con extractos para observar posible acción hemaglutinante o de hemólisis. Para evaluar el nivel de actividad aglutinante se realizó un ensayo de hemaglutinación utilizando como control positivo judía pinta, caracterizado por su alto poder aglutinante, y como control de hemólisis el suero fisiológico (NaCl).

Como se observa en la **Figura 34**, se puede observar que el control positivo provocó una aglutinación superior al 50% de los eritrocitos en todas las diluciones analizadas. Este resultado indica que el control (judía pinta) tiene una fuerte capacidad para inducir la aglutinación, lo que es un indicador de su alta reactividad con los eritrocitos. En contraste, el extracto de DMB® no mostró signos de aglutinación en ninguna de las diluciones evaluadas, lo que sugiere la ausencia de interacción con los eritrocitos bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Por otro lado, no se evidenció actividad hemolítica por parte del extracto de DMB®. Esto se puede concluir al observar que los eritrocitos permanecen intactos en comparación con el control positivo (agua), en el cual la lisis celular fue evidente, ya que los eritrocitos no fueron visibles, confirmando la ruptura de las membranas celulares.

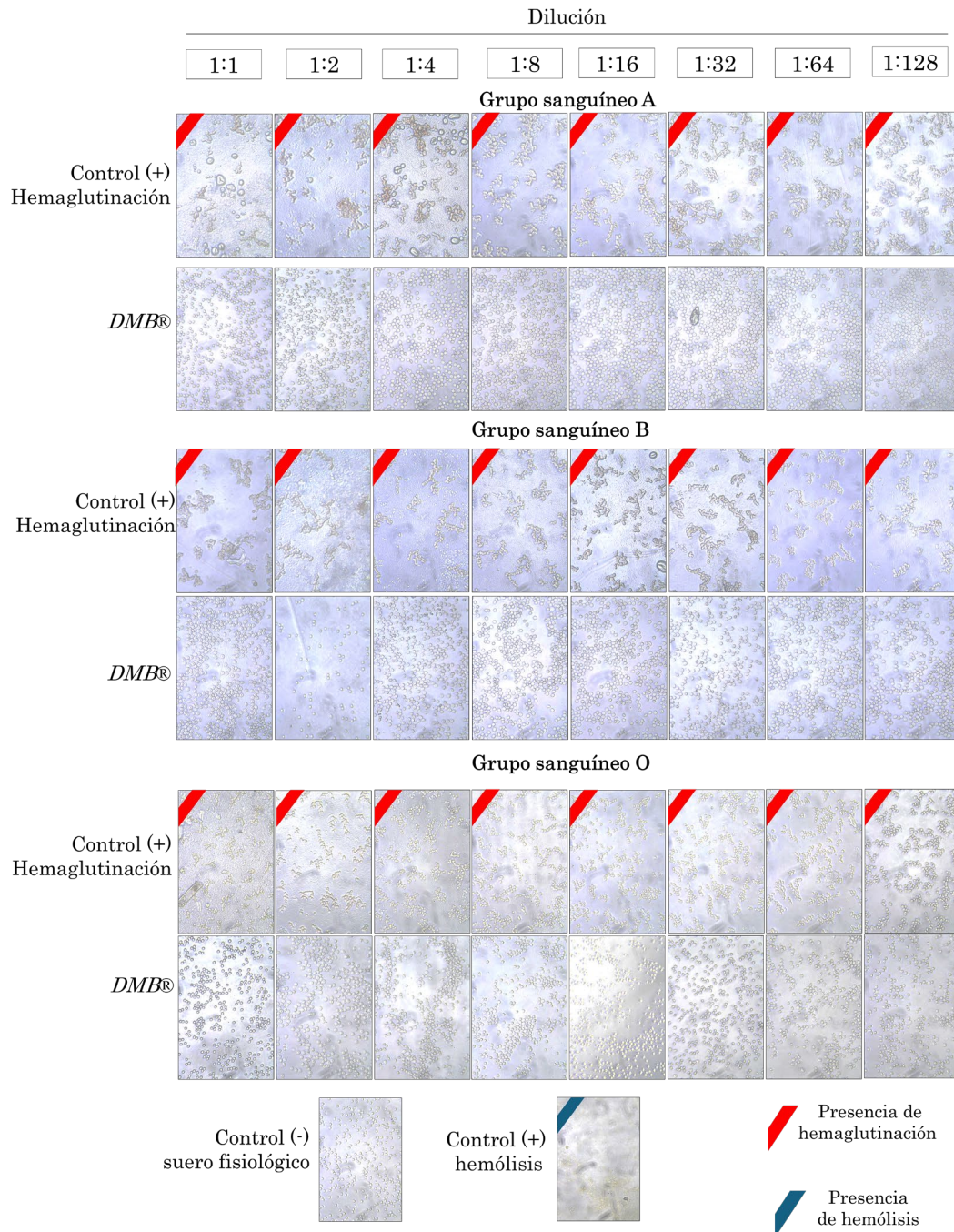


Figura 34 | Representación del grado de hemaglutinación del extracto acuoso de DMB®.

Micrografías a 200x muestran tres condiciones: extracto de judía pinta (control positivo), suero fisiológico (control negativo) y extracto de DMB®, diluidos en PBS 1X o agua. En la parte superior se observan diluciones seriadas (1:1 a 1:128). Cada condición se evaluó en grupos sanguíneos A, B y O (n=3), con tres fotos por ensayo y condición, capturando diferentes campos de visión. Las fotografías con marcas rojas indican $\geq 50\%$ de aglutinación, y las azules indican hemólisis.

The background of the page is a detailed illustration of the Sapote plant (*Synsepalum dulcificum*). It shows several large, smooth, reddish-orange fruits hanging from a green stem. The leaves are large, ovate, and have prominent veins. In the foreground, a single fruit is cut open, revealing a white, fleshy interior with a large, dark, oval-shaped seed in the center. The entire illustration is rendered in a soft, painterly style with a light green tint.

5.2. Semilla de *Synsepalum dulcificum*

5.2.1. Obtención y cuantificación antioxidante de los compuestos fenólicos de semilla de *Synsepalum dulcificum*

i. Determinación capacidad antioxidante de semilla de *Synsepalum dulcificum*

Se obtuvieron compuestos fenólicos mediante disolventes agua, etanol y metanol con el propósito de evaluar la eficiencia de los disolventes en la extracción de estos compuestos y determinar su capacidad antioxidante mediante la técnica con DPPH.

Se observó que los valores máximos de capacidad antioxidante se obtuvieron con el solvente etanol al 70%, alcanzando 18 ± 4 $\mu\text{mol trolox/ g peso seco (PS)}$ (Figura 35). Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas con respecto al etanol con 40% con 10 ± 4 $\mu\text{mol trolox/ g peso seco}$. Motivo por el que este disolvente se seleccionó para identificar compuestos fenólicos y todos los ensayos celulares.

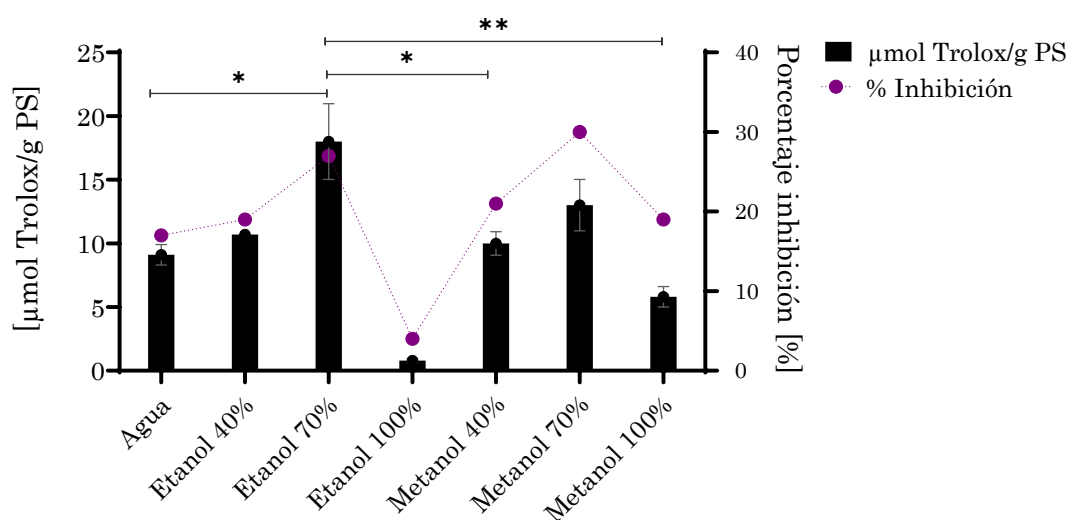


Figura 35 | Efecto de disolvente sobre la capacidad antioxidante de semilla de *Synsepalum dulcificum*. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza ($n=3$). Se utilizó ANOVA de una vía para comparar los grupos, indicando diferencias estadísticamente significativas con respecto al etanol al 70%, mediante asteriscos superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

5.2.2. Identificación de compuestos de semilla de *Synsepalum dulcificum* mediante CG-MS

Para identificar los compuestos presentes en la semilla, se realizaron análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Como se ha mencionado con anterioridad, debido a la necesidad de limitar el número de muestras para esta técnica, se seleccionó el extracto obtenido con etanol al 40%, ya que fue el disolvente utilizado en los ensayos celulares, lo que permite identificar posibles compuestos responsables del efecto celular. Los compuestos identificados fueron comparados con las bases de datos de espectros de masas (NIST), lo que permitió confirmar su identidad

Para un mismo tiempo de retención, se detectaron tres posibles compuestos, lo que sugiere la presencia de isómeros o compuestos con estructuras químicas similares al igual que en DMB®. Los resultados de este análisis se presentan detalladamente en la **Tabla 11**, donde se muestran los compuestos ordenados por tiempo de retención (TR) de menor a mayor, incluyendo su fórmula molecular y su identificador alfanumérico (InChIKey). Algunos ejemplos de los compuestos identificados con interés comercial son:

- **Polialcoholes:** Eritritol, glicerina y diglicerol, compuestos conocidos por sus propiedades humectantes y su uso en la industria alimentaria y farmacéutica.
- **Fenoles:** Catecol, resorcinol e hidroquinona, los cuales son importantes por sus propiedades antioxidantes y aplicaciones en cosmética y medicina.
- **Ácidos grasos:** Ácido dodecanoico, 3-hidroxi-ácido pentadecanoico y estearato de metilo, que desempeñan un papel crucial en la biología celular y tienen múltiples aplicaciones industriales.
- **Ácidos carboxílicos:** Ácido 10,12-docosadiinoico, un compuesto de interés por sus propiedades biológicas y potenciales aplicaciones en materiales avanzados.
- **Carbohidratos:** Melezitosa y paromomicina, que son importantes tanto en procesos metabólicos como en la formulación de productos farmacéuticos.

Tabla 11 | Compuestos identificados en extracto etanólico de semilla de *S. dulcificum* mediante GC-MS

Pico	Tiempo de retención	Opción 1	Formula molecular	InChIKey	Opción 2	Formula molecular	InChIKey	Opción 3	Formula molecular	InChIKey
1	5,53	2,2-Dimetoxibutano	C6H14O2	OXQHJIGWZNIQDS-UHFFFAOYSA-N	Butanamida, 2-hidroxi-N,3,3-trimetil-	C7H15NO2	TVHTUPVHFMTSQT-UHFFFAOYSA-N	6-Propiltetrahidro-2H-tiopiran-2-ona	C8H14OS	PRSGGNQGDWGRPA-UHFFFAOYSA-N
2	10,38	Glicerina	C3H8O3	PEDCQBHVIMGVH-UHFFFAOYSA-N	Eritritol	C4H10O4	UNXHWFMMPAWVPI-ZXZARUISSA-N	Diglicerol	C6H14O5	GPLRAVKSCUXZTP-UHFFFAOYSA-N
3	12,61	Catecol	C6H6O2	YCIMNLLNPGFGHC-UHFFFAOYSA-N	Resorcinol	C6H6O2	GHMLBKRAJCCXBS-UHFFFAOYSA-N	Hidroquinona	C6H6O2	QIGBRXMKCJ KVMJ-UHFFFAOYSA-N
4	15,39	Ácido dodecanoico, 3-hidroxi-	C12H24O3	MUCMKTPAZLSKTL-UHFFFAOYSA-N	Melezitosa	C18H32O16	QWIZNVHXZXPDR-WSCXOGTSA-N	Paromomicina	C23H45N5O14	UOZODPSAJZTQNH-LSWJJEBSA-N
5	17,31	Desulfozinigrina	C10H17NO6S	NMXWTQFCMCSVFH-IZZDOVSWSA-N	Melezitosa	C18H32O16	QWIZNVHXZXPDR-WSCXOGTSA-N	- 2-(Etilenodioxo)etilamina, N-metil-N-[4-(1-pirrolidinil)-2-butilinil]-	C14H24N2O2	YXTULESBNUVDIP-UHFFFAOYSA-N
6	19,82	Ácido hexadecanoico, éster metílico	C17H34O2	FLIACVVOZYBSBS-UHFFFAOYSA-N	Ácido pentadecanoico, 13-metil-, éster metílico	C17H34O2	FRGDXZRZDAJTJU-UHFFFAOYSA-N	Ácido ciclopropanebutanoico, 2-[[2-[[2-(2-pentilciclopropil)metilciclo]ácido	C25H42O2	FAQZFDJDTUMBJS-UHFFFAOYSA-N
7	20,11	l-(+)-Ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato	C38H68O8	TUYRNAGGLJZRNLBHVUFDKSA-N	Ácido n-hexadecanoico	C16H32O2	IPCSVZSSVZVIGE-UHFFFAOYSA-N	Ácido pentadecanoico	C15H30O2	WQEPLUGTL DZJY-UHFFFAOYSA-N
8	21,41	Ácido heptadecanoico, 16-metil-, éster metílico	C19H38O2	KDQIFKQWPMBNH-UHFFFAOYSA-N	Ácido heptadecanoico, 9-metil-, éster metílico	C19H38O2	LHMFGSGXYZNXSOT-UHFFFAOYSA-N	Estearato de metilo	C19H38O2	WQEPLUGTL DZJY-UHFFFAOYSA-N
9	21,54	Ácido cis-13-octadecenoico	C18H34O2	BDLLSHRIFPDGQBWAYWQWQTSAN	Ácido cis-vaccénico	C18H34O2	UWHZIFQPPBDJPMFPLPWBNSA-N	Ácido trans-13-octadecenoico	C18H34O2	BDLLSHRIFPDGQB-AATRIKPKSA-N
10	24,08	Ácido 10,12-docosadienoico, derivado 2TMS	C28H50O4Si2	SUPMFZZCWCKIAQUHFFFAOYSA-N	1,3-Xilil-18-corona-5, 2-(9-borabicyclo[3.3.1]non-9-il)-	C24H37BO5	VMICPXIAUUKOSBUHFFFAOYSA-N	Ácido octadecanoico, 3-oxo-, éster metílico	C19H36O3	UKKQXJNTICLENY-UHFFFAOYSA-N
11	24,26	Ácido hexadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil éster	C19H38O4	BBNYCLAREVXOSGUHFFFAOYSA-N	Glicerol 1-palmitato	C19H38O4	QHZLMUACJMDIAEUHFFFAOYSA-N	Ácido hexadecanoico, 1-(hidroximetil)-1,2-etano di éster	C35H68O5	JEJLGIQLPYYGEE-UHFFFAOYSA-N
12	26,23	Ácido octadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil éster	C21H42O4	YQEMORVAKMFKLG-UHFFFAOYSA-N	Ácido octadecanoico, 2,3-dihidroxipropil éster	C21H42O4	VBICKXHEKHSIBGUHFFFAOYSA-N	Ácido hexadecanoico, 1-(hidroximetil)-1,2-etano di éster	C35H68O5	JEJLGIQLPYYGEE-UHFFFAOYSA-N

5.2.3. Efecto anticancerígeno de semilla de *Synsepalum dulcificum*

i. Citotoxicidad aguda en cáncer colorrectal mediante semilla de *Synsepalum dulcificum*

Con el objetivo de determinar si los compuestos obtenidos con etanol al 40% de semilla poseen efectos anticancerígenos, se trataron las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW480 y SW620. Para ello, primeramente, se determinó la concentración inhibitoria media (CI50), lo cual permitió evaluar la eficacia del extracto en inhibir el crecimiento celular.

En la **Figura 36**, se observa una reducción en el crecimiento celular de forma dependiente de la dosis del extracto, con una relación inversa entre la cantidad administrada y la viabilidad celular. A medida que se incrementó la concentración del extracto, se observó una disminución significativa en la viabilidad de las células cancerosas. Los valores de CI50, como se ha mencionado con anterioridad que indican la concentración del extracto necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular, fueron de 0,15 mg/mL para las líneas celulares DLD-1 y HT-29, 0,21 mg/mL para SW620 y 0,31 mg/mL para SW480. Estos resultados sugieren una respuesta diferencial entre las líneas celulares, siendo las células SW480 las más resistentes al tratamiento.

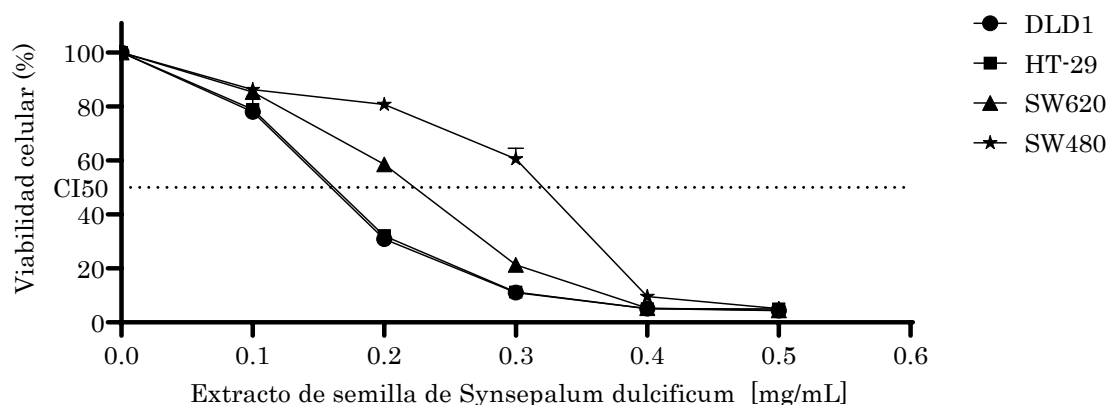


Figura 36 | Valores CI50 de líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con extracto semilla de *Synsepalum dulcificum*. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=3). Los valores de CI50 se calcularon con GraphPad Prism 8.0.1. Se realizaron 3 ensayos independiente, con 4 réplicas cada uno.

ii. Citotoxicidad crónica en cáncer colorrectal mediante semilla de *Synsepalum dulcificum*

Con el objetivo de evaluar posible resistencia o sensibilidad celular al extracto de semilla. Se expusieron las células metastásicas SW620 durante 74 días con 0,0133 mg/mL (equivalente al CI3) de extracto de semilla.

En la **Figura 37**, se observa que la curva correspondiente a las células tratadas con extracto de semilla (color amarillo) presenta una proliferación similar a la de las células control (color negro) durante los primeros días del experimento. No obstante, a partir del día 43, la curva de las células tratadas supera a la de las células control, lo que podría indicar que las células están desarrollando resistencia al extracto de semilla.

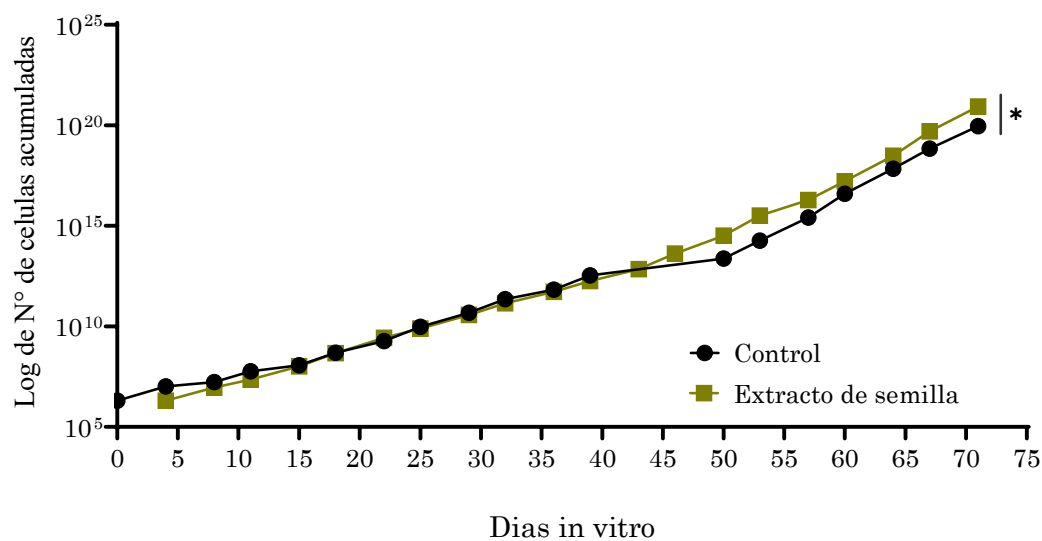


Figura 37 | Curva de crecimiento de la línea celular SW620 en presencia de extracto de semilla de *Synsepalum dulcificum*. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=2). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001) determinadas mediante la prueba de Wilcoxon.

Para evaluar la posible resistencia al tratamiento con semilla, se realizó un ensayo dosis-respuesta en combinación con el quimioterapéutico oxaliplatino. Los valores

de concentración de inhibición de las células SW620 se determinó mediante el ensayo MTT después de 72 horas de exposición a once concentraciones distintas de oxaliplatino (0, 0,040, 0,097, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como control negativo se empleó medio de cultivo DMEM suplementado.

En la **Figura 38**, se observa un efecto similar entre el quimiofármaco oxaliplatino sobre las células tratadas con DMB® (curva azul) y las células control (curva roja) a concentraciones bajas de oxaliplatino. Sin embargo, a concentraciones más elevadas (recuadro verde), se aprecia una disminución del crecimiento celular de hasta un 10% en las células previamente tratadas con semilla, en comparación al control (células sin tratar). Las células viables a estas concentraciones suelen ser las resistentes al quimiofármaco.

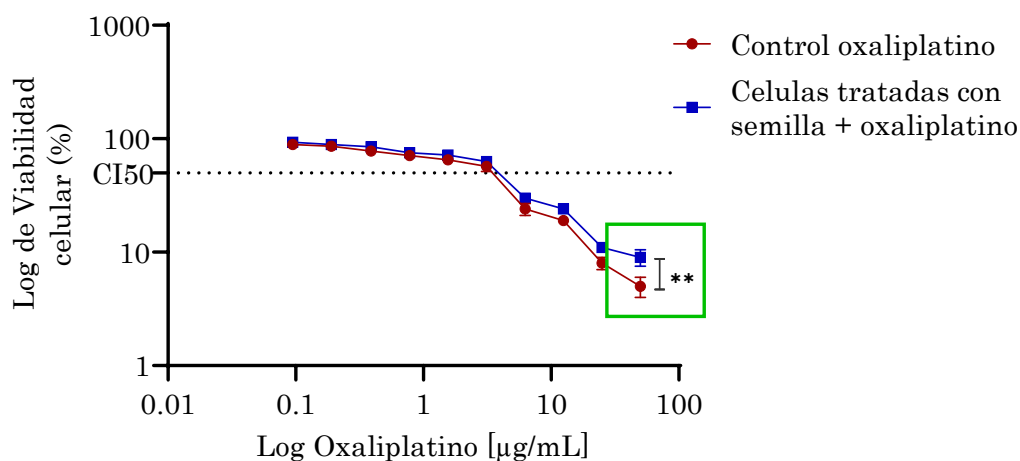


Figura 38 | Dosis-respuestas a oxaliplatino de línea metastásica SW620 tratadas con extracto de semilla de *Synsepalum dulcificum*. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza ($n=3$). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) determinadas mediante la prueba de Wilcoxon.

Posteriormente, se analizaron 13 biomarcadores tumorales mediante citometría de las células tratada de forma crónica. El objetivo de este análisis fue observar los niveles de expresión de estos biomarcadores tumorales y compararlos con los niveles de control. Esto podría permitir entender mejor la dinámica del tumor.

En la **Figura 39**, se presenta la expresión de diversos biomarcadores tumorales, expresada en términos de veces de aumento en comparación con el grupo control, que incluye BCRP1, AC133, CD133, LGR5, CD166, CD34, EPCAM, CD36, CD44V6 y TROP2. Los datos muestran que la mayoría de los biomarcadores no experimentan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con extracto de semilla, lo que sugiere una permanencia en la expresión de estos marcadores bajo las condiciones evaluadas. No obstante, cabe destacar que el biomarcador RAGE muestra una reducción significativa en el grupo tratado con el extracto de semilla.

Biomarcadores tumorales

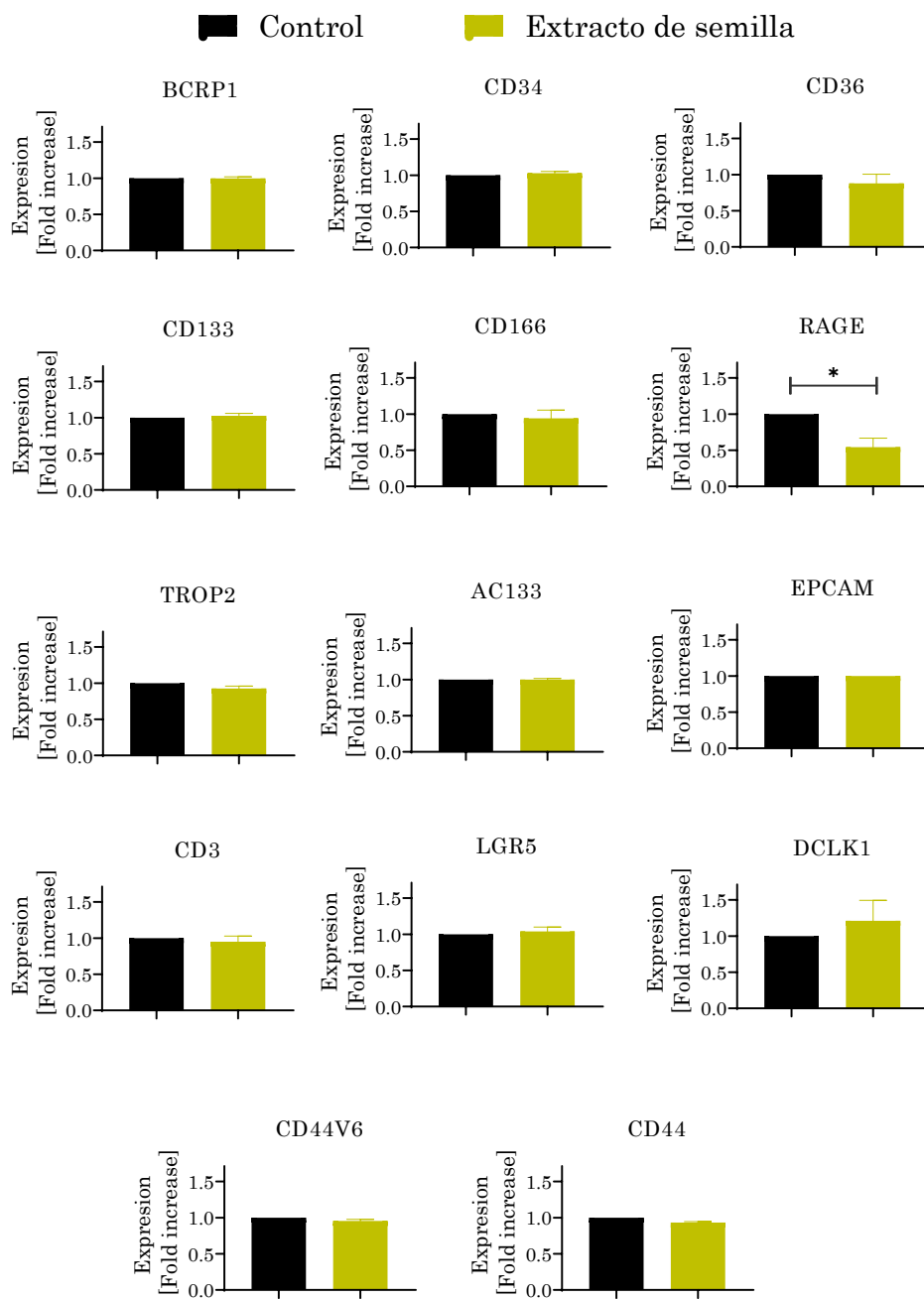


Figura 39 | Expresión de biomarcadores tumorales en línea celular de cáncer colorrectal (SW620) bajo exposición constante a extracto de semilla con concentración fija (0,0133 mg/mL). Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=4). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) determinadas mediante ANOVA de una vía.

5.2.4. Efecto inmunomodulador de semilla de *Synsepalum dulcificum*

Se trataron los linfocitos con extracto obtenido con etanol al 40% de semilla para evaluar una posible activación del sistema inmunitario, ya que se ha reportado que varios tipos de semilla tienen esta peculiaridad (Mishra et al., 2022).

Los resultados del análisis preliminar de citometría de flujo se presentan en la **Figura 40**. La gráfica muestra los perfiles de los histogramas, que representan la distribución de la expresión de los marcadores celulares CD3, CD4, CD8 y CD19 bajo diferentes condiciones de tratamiento: control (color verde), 10 $\mu\text{g/mL}$ (color azul), 20 $\mu\text{g/mL}$ (color rojo) y 100 $\mu\text{g/mL}$ (color naranja). En los histogramas, el eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia, mientras que el eje Y muestra el recuento de células (Count) que exhiben dichas intensidades. Se observa un desplazamiento hacia la derecha en los marcadores CD3, CD8 y CD4, lo que sugiere una activación de estas células. Sin embargo, en el caso de CD19, no se observa un aumento en la expresión de las células B, responsables de la producción de anticuerpos.

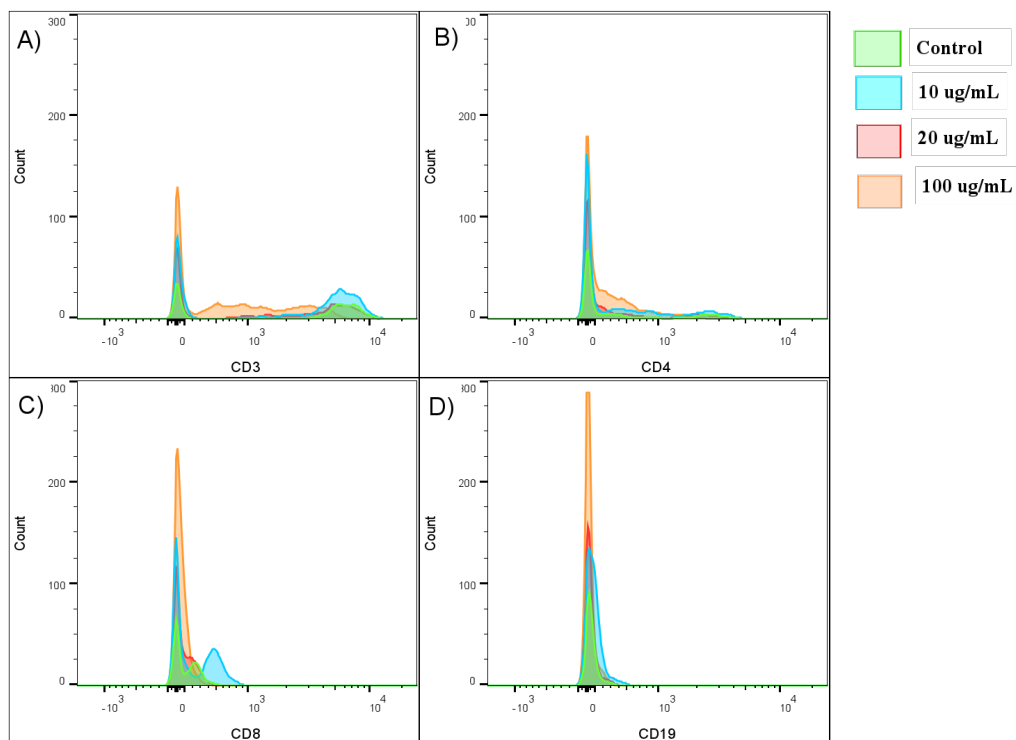


Figura 40 | Expresión de biomarcadores linfocitario tras exposición semilla de *Synsepalum dulcificum*. Representación de los perfiles de histograma de las frecuencias del fenotipo celular con relación a la expresión de biomarcadores.

5.2.5. Actividad aglutinante de semilla de *S. dulcificum*

Con el objetivo de corroborar la seguridad alimentaria del extracto de semilla, como lo solicita la EFSA al ingresar alimentos por primera vez en España, se trataron eritrocitos con extractos para observar posibles acciones hemaglutinantes o de hemólisis.

Como se observa en la **Figura 41**, el extracto de semilla indujo hemólisis a diluciones más bajas (concentraciones elevadas) del extracto. Sin embargo, en la dilución más alta evaluada (1:128), se aprecia una disminución en la acción hemolítica, lo que sugiere que la capacidad del extracto para causar hemólisis disminuye a medida que la concentración de este se reduce. Esto podría indicar una relación directa entre la concentración del extracto y su efecto hemolítico, sugiriendo la presencia de un umbral a partir del cual su acción es significativamente menor. Este fenómeno se debe a la ruptura de las membranas de los eritrocitos, lo que resulta en la liberación de hemoglobina al medio circundante.

Dado que la hemólisis es un proceso opuesto a la hemaglutinación, donde los eritrocitos se agregan formando masas visibles, no es posible observar hemaglutinación en las muestras tratadas con el extracto de semilla. En contraste, la ausencia de agregados celulares visibles (como se aprecia en el control positivo a hemolisis) indica que la acción del extracto provoca lisis celular en vez de aglutinación.

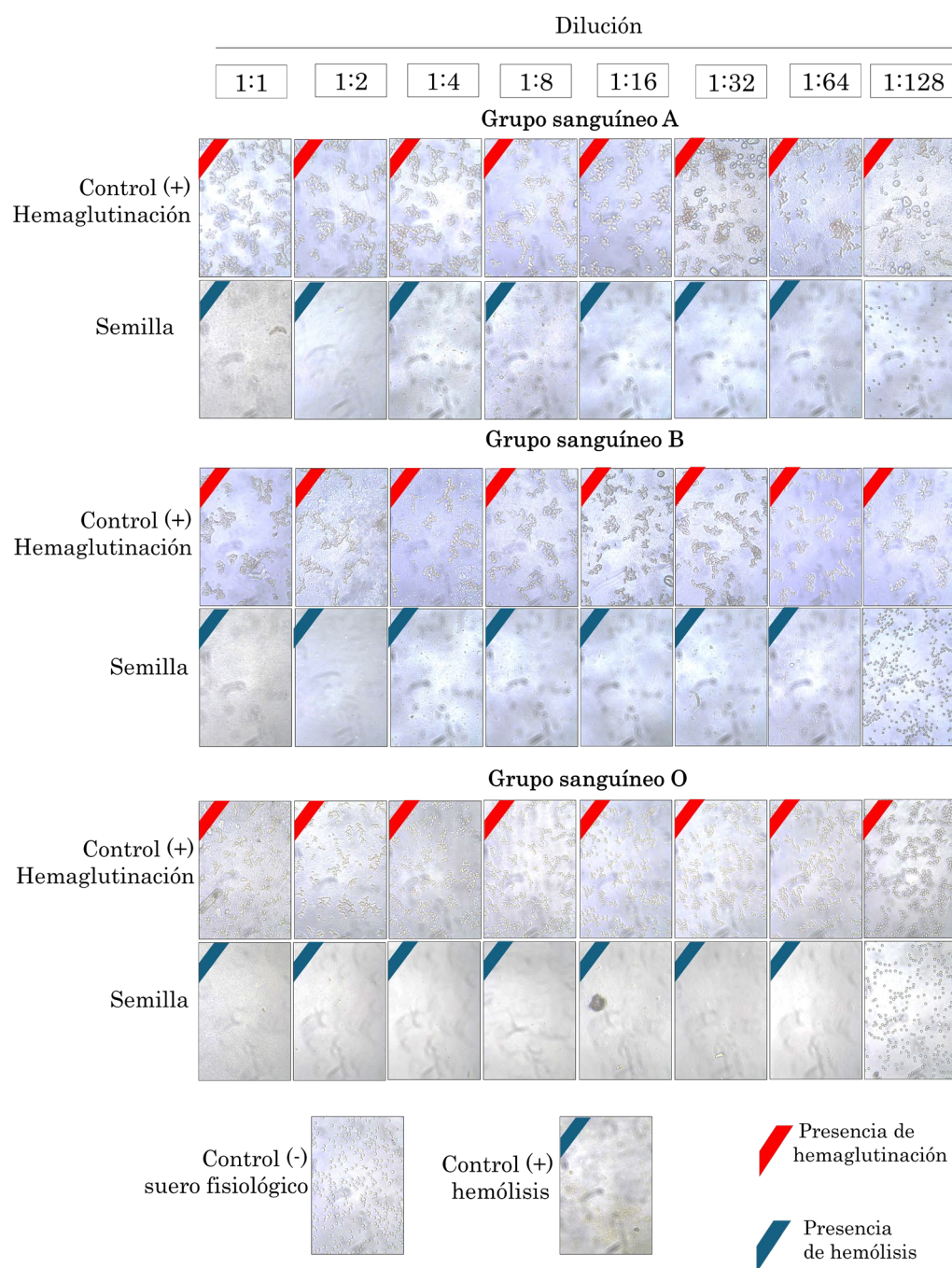



Figura 41 | Representación del grado de hemaglutinación de semilla de *Synsepalum dulcificum*. Micrografías a 200X muestran tres condiciones: extracto de judía pinta (control positivo), suero fisiológico (control negativo) y extracto de DMB®, diluidos en PBS 1X o agua. En la parte superior se observan diluciones seriadas (1:1 a 1:128). Cada condición se evaluó en grupos sanguíneos A, B y O (n=3), con tres fotos por ensayo y condición, capturando diferentes campos de visión. Las fotografías con marcas rojas indican $\geq 50\%$ de aglutinación, y las azules indican hemólisis.



5.3. Hoja de *Synsepalum dulcificum*

5.3.1. Obtención y cuantificación antioxidante de los compuestos fenólicos de semilla de *S. dulcificum*

*i. Determinación capacidad antioxidante de hoja de *Synsepalum dulcificum**

Se obtuvieron compuestos fenólicos mediante disolventes agua, etanol y metanol con el propósito de evaluar la eficiencia de los disolventes en la extracción de estos compuestos y determinar su capacidad antioxidante mediante la técnica con DPPH.

En la **Figura 42**, se muestra el efecto de disolvente sobre la capacidad antioxidante de la hoja de *S. dulcificum*. Los resultados se expresan como μmol de trolox equivalente por gramo de materia seca y se cuantifico mediante la técnica DPPH. Los valores máximos se obtuvieron con el solvente etanol al 70%, alcanzando $18 \pm 4 \mu\text{mol trolox/ g peso seco (PS)}$. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas con respecto al etanol con 40% con $10 \pm 4 \mu\text{mol trolox/ g peso seco}$. Motivo por el que este disolvente se seleccionó para identificar compuestos fenólicos y realizar ensayos celulares.

*ii. Comparación de capacidad antioxidante de hoja de *Synsepalum dulcificum* frente a infusiones y té*

Un mercado potencial identificado es el de las infusiones, en el cual la hoja podría ser valorada y aprovechada. Con este propósito, se procedió a la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de cinco variedades de té (verde, blanco, negro, rooibos y oolong) y cuatro tipos de infusiones (yerba mate, menta, jazmín y manzanilla). Para realizar la comparación, se extrajeron los compuestos de cada una de las infusiones utilizando etanol al 40% como disolvente, seleccionado debido a su eficacia previamente demostrada en la extracción de compuestos fenólicos.

En el extracto de hoja de *S. dulcificum* ($340 \pm 13 \mu\text{mol trolox/ g muestra seca}$) no presenta diferencias significativas en comparación con los extractos de té blanco, té rooibos, yerba mate y menta, con valores de 540 ± 25 ; 188 ± 21 ; 649 ± 58 ; 381 ± 15 y $192 \pm 15 \mu\text{mol trolox/ g muestra seca}$, respectivamente. El valor más alto se obtuvo

con la infusión de jazmín, con $817 \pm 32 \mu\text{mol trolox/ g}$ muestra seca, mientras que el valor más bajo se encuentra en la infusión de manzanilla con $54 \pm 5 \mu\text{mol trolox/ g}$ muestra seca (Figura 43).

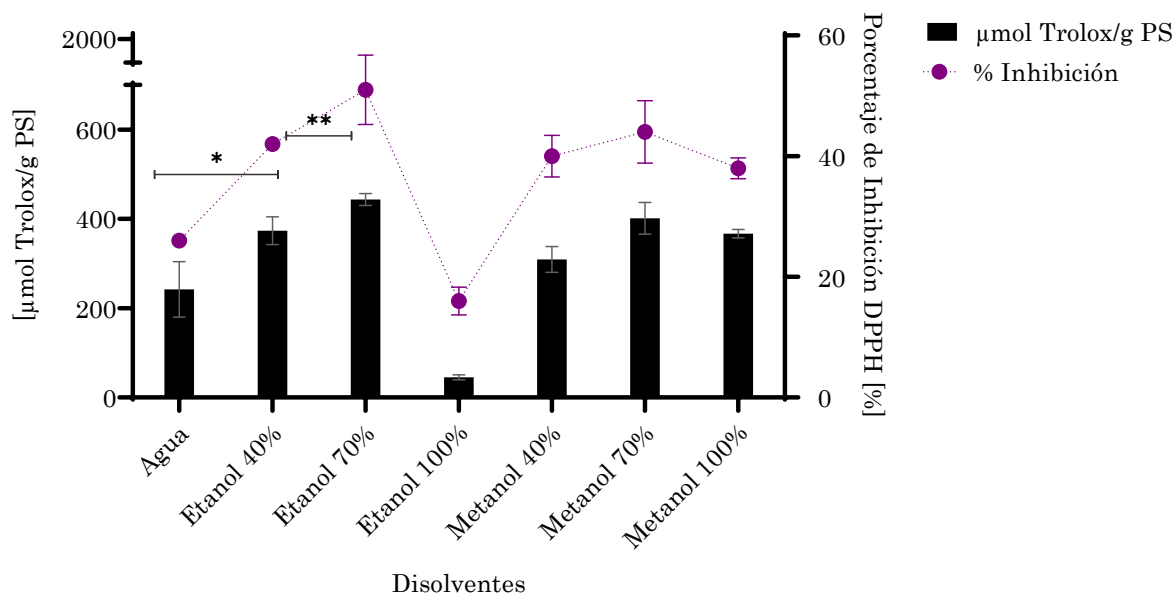


Figura 42 | Efecto de disolventes sobre el porcentaje de inhibición al radical DPPH de hoja de *Synsepalum dulcificum* mediante. El gráfico muestra barras de error estándar ($n=3$) para representar el intervalo de confianza. Se utilizó ANOVA de una vía para comparar los grupos, indicando diferencias estadísticamente significativas respecto al etanol al 70%, señaladas con asteriscos superíndices según el nivel de significancia (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

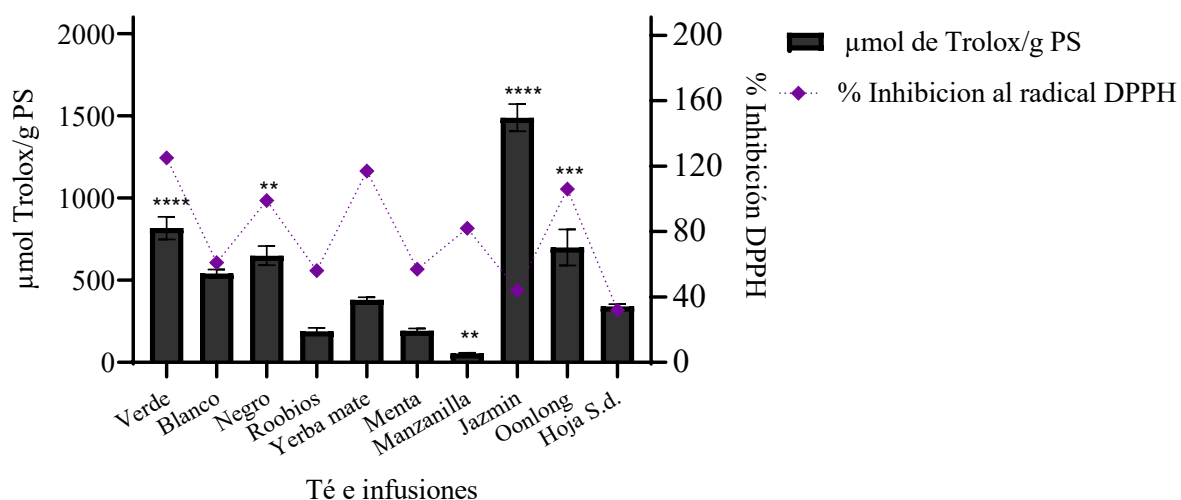


Figura 43 | Capacidad antioxidante de diferentes tés e infusiones mediante las técnicas DPPH. El gráfico de barras muestra la capacidad antioxidante de varios tés (verde, blanco, negro, roobios y oolong) e infusiones (yerba mate, menta, manzanilla, jazmín), expresada en μmol equivalentes a trolox por gramo de materia seca, mientras que el gráfico de puntos indica el porcentaje de inhibición. Las barras de error estándar representan el intervalo de confianza ($n=3$). Las comparaciones entre grupos se realizaron con ANOVA de una vía, indicando diferencias significativas respecto a la hoja de *S. dulcificum* mediante asteriscos superíndices según el nivel de significancia (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

5.3.2. Identificación de compuestos de hoja de *Synsepalum dulcificum* mediante CG-MS

Se analizaron los compuestos extraídos utilizando etanol al 40% como disolvente, con el objetivo de identificar posibles compuestos no reportados previamente en la literatura científica. Para ello, se empleó la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), la cual es reconocida por su alta sensibilidad y especificidad en la identificación de compuestos volátiles y semivolátiles.

Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con las bases de datos estandarizadas del National Institute of Standards and Technology (NIST), lo que permitió identificar parte de los compuestos presentes en las muestras. Para un

mismo tiempo de retención, se detectaron tres posibles compuestos, lo que sugiere la presencia de isómeros o compuestos con estructuras químicas similares. Los resultados de este análisis se presentan detalladamente en la **Tabla 12**, donde se muestran los compuestos ordenados por tiempo de retención (TR) de menor a mayor, incluyendo su fórmula molecular y su identificador alfanumérico (InChIKey). Algunos ejemplos de los compuestos identificados con interés comercial son:

- **Derivados de Furano:** se identificaron compuestos como Furaneol, 2,5-Dimethylfuran-3,4(2H,5H)-dione y 2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one, que son conocidos por sus propiedades aromáticas y su uso en la industria alimentaria y de fragancias.
- **Derivados de Pirano:** 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- y 2-Propyl-tetrahydropyran-3-ol, los cuales también poseen aplicaciones en la industria de sabores y fragancias debido a sus características organolépticas.
- **Ácidos Orgánicos:** Quinic acid, n-Hexadecanoic acid y Pentadecanoic acid, así como Glycerol 1-palmitate. Estos compuestos tienen importancia en la industria alimentaria y farmacéutica por sus propiedades conservantes y bioactivas.
- **Aminoácidos:** Se identificó e-N-Formyl-L-lysine, un aminoácido modificado que puede tener implicaciones en procesos biológicos específicos y que es de interés en estudios relacionados con la nutrición y la biotecnología.

Tabla 12 | Compuestos identificados en extracto etanólico (40%) de hoja de *S. dulcificum* mediante GC-MS

Pico	Tiempo de retención	Opción 1	Formula molecular	InChIKey	Opción 2	Formula molecular	InChIKey	Opción 3	Formula molecular	InChIKey
1	10,66	2,5-Dimetilfuran-3,4(2H,5H)-diona	C6H8O3	PUVDDHUFFRRF-MN-UHFFFAOYSA-N	Furaneol	C6H8O3	INAXVXBKKUCGI-UHFFFAOYSA-N	Glicerina	C3H8O3	PEDCQBHVIMGV-HV-UHFFFAOYSA-N
2	11,86	4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	C6H8O4	VOLMSPGWNYJH-QQ-UHFFFAOYSA-N	2,4-Dihidroxi-2,5-furano-3-ona	C6H8O4	GMQUMWVEWMCM-OQ-UHFFFAOYSA-N	2-Propil-tetrahidropiran-3-ol	C8H16O2	SMMBPJGNKCW-QPY-UHFFFAOYSA-N
3	17,27	Ácido quínico	C7H12O6	AAWZDTNXLGEC-EK-LNVDRNJUSA-N	9-Oxabiclo[3,3,1]nonan-2-ona, 5-hidroxi-	C8H12O3	MSMFHMFXIYSXSQ-UHFFFAOYSA-N	e-N-Formil-L-lisina	C7H14N2O3	KLPJXDPPMSJW-KI-LURJTMIESA-N
4	20,11	1-(+)-Ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato	C38H68O6	TUYRNAGGLJZRN-M-LBHUVFDKSA-N	Ácido n-hexadecanoico	C16H32O2	IPCSVZSSVZVIGE-UHFFFAOYSA-N	Ácido pentadecanoico	C15H30O2	WQEPLUUGTLDZ-JY-UHFFFAOYSA-N
5	24,26	Ácido hexadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil	C19H38O4	BBNYCLAREVXO-SG-UHFFFAOYSA-N	Glicerol 1-palmitato	C19H38O4	QHZLNUACJMDIAE-UHFFFAOYSA-N	Éster del ácido hexadecanoico, 1-(hidroximetil)-1,2-etano diilo	C35H68O5	JEJLGHQLPPYGE-E-UHFFFAOYSA-N

5.3.3. Efecto anticancerígeno de hoja de *Synsepalum dulcificum*

i. Citotoxicidad aguda en cáncer colorrectal mediante hoja de *Synsepalum dulcificum*

Con el objetivo de determinar si los compuestos obtenidos con etanol al 40% de hoja poseen efectos anticancerígenos, se trataron las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW480 y SW620. Al igual que en DMB® y semilla se determinó la concentración inhibitoria media (CI50).

Como se observa en la **Figura 44**, el extracto redujo la viabilidad celular de manera inversa de la dosis, de modo que, a mayor concentración administrada, menor fue el porcentaje de células viables. Los valores de CI50 obtenidos para cada una de las líneas celulares analizadas fueron los siguientes: 1,30 mg/mL para DLD-1, 1,24 mg/mL para HT-29, 0,97 mg/mL para SW480 y 1,51 mg/mL para SW620. Estos resultados indican una respuesta diferencial entre las distintas líneas celulares, mostrando una variación en los niveles de inhibición según la concentración administrada. En particular, la línea celular SW480 mostró el valor de CI50 más bajo, mientras que la línea SW620 presentó el valor más alto. Estos valores sugieren que el extracto tiene una actividad inhibitoria en todas las líneas evaluadas, aunque con diferentes grados de eficacia. La variación de los valores de

CI50 destaca la distinta sensibilidad de las células cancerosas bajo las mismas condiciones experimentales.

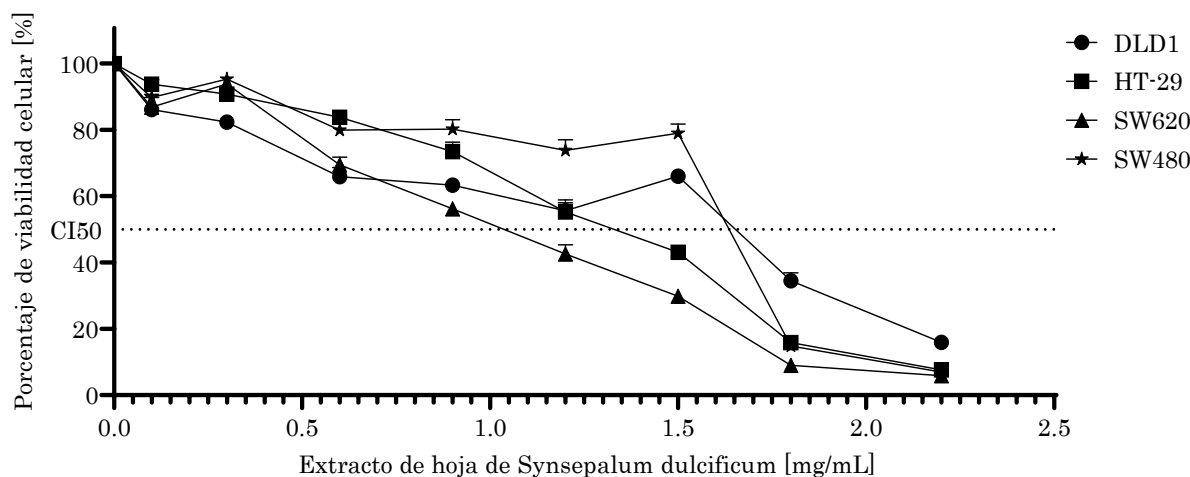


Figura 44 | Valores CI50 de líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con extracto etanólico de hoja de *Synsepalum dulcificum*. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=3). Los valores de CI50 se calcularon con GraphPad Prism 8.0.1. Se realizaron 3 ensayos independiente, con 4 réplicas cada uno

ii. Citotoxicidad crónica en cáncer colorrectal mediante hoja de *Synsepalum dulcificum*

Con el objetivo de evaluar posible resistencia o sensibilidad celular al extracto de hoja. Se expusieron las células metastásicas SW620 durante 74 días con 0,072 mg/mL (equivalente al CI3) de extracto de hoja.

En la **Figura 45**, se observa que la curva de crecimiento de las células tratadas con el extracto de hoja (color verde) sigue un patrón similar al de las células control (color negro) durante los primeros 50 días del experimento. A partir de ese punto, se evidencia una disminución en la proliferación celular, que se acentúa progresivamente hasta llegar a una completa inhibición del crecimiento en el día 60. En comparación con las células control, que mantuvieron una proliferación relativamente estable durante todo el período.

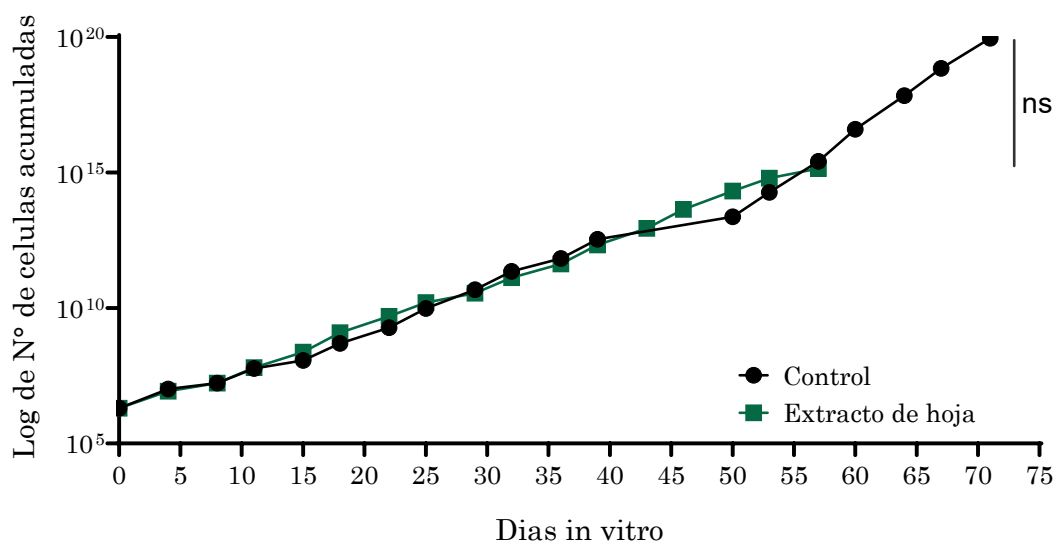


Figura 45 | Curva de crecimiento de la línea celular SW620 en presencia de extracto de hoja de *Synsepalum dulcificum*. Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=2). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) determinadas mediante la prueba de Wilcoxon.

En los días previos a la muerte celular, se analizaron 13 biomarcadores tumorales mediante citometría de las células tratada de forma crónica. El objetivo de este análisis fue observar los niveles de expresión de estos biomarcadores tumorales y compararlos con los niveles de control. Esto podría permitir entender mejor la dinámica del tumor.

En la **Figura 46**, se presenta la expresión de diversos biomarcadores tumorales, expresada en términos de veces de aumento en comparación con el grupo control, que incluye BCRP1, AC133, CD133, LGR5, CD166, CD34, EPCAM, CD36, CD44V6 y TROP2. Los datos muestran que los biomarcadores no experimentan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con extracto de hoja.

Biomarcadores tumorales

■ Control ■ Extracto de hoja

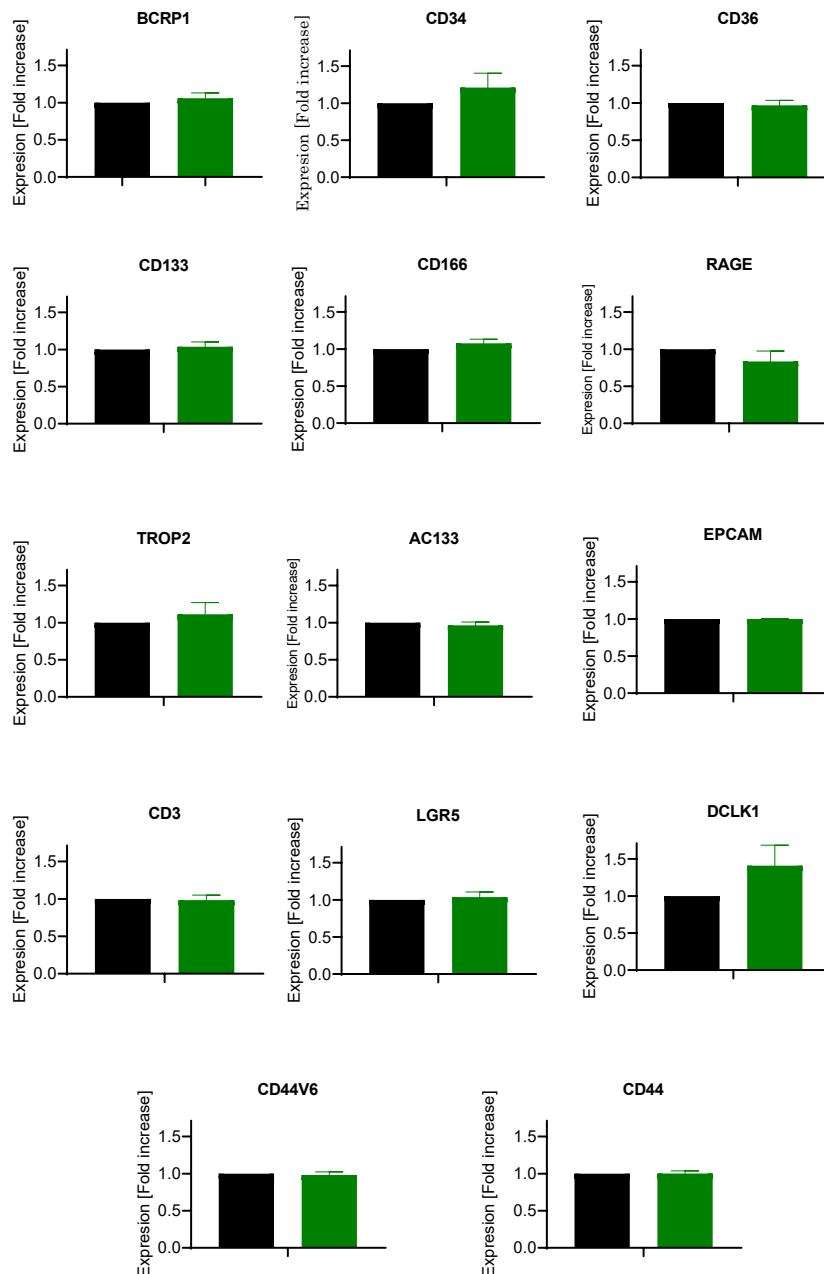


Figura 46 | Expresión de biomarcadores tumorales en línea celular de cáncer colorrectal (SW620) bajo exposición constante a extracto de hoja con concentración fija (0,0072 mg/mL). Se representan barras de error estándar para mostrar el intervalo de confianza (n=4). Las diferencias significativas con relación a se indican con asteriscos, indicando niveles de significancia estadística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) determinadas mediante ANOVA de una vía.

5.3.4. Efecto inmunomodulador de hoja de *S. dulcificum*

De la misma manera que se ha realizado anteriormente con los extracto de DMB® y semilla, se trataron linfocitos con extracto obtenido con etanol al 40% de hoja para evaluar una posible activación del sistema inmunitario, ya que se ha reportado que varios tipos de hoja pueden inducir activación del sistema inmune (Laily et al., 2015; Magrone et al., 2017; Salomón et al., 2020) .

Los resultados del análisis preliminar de citometría de flujo se presentan en la **Figura 47**. La gráfica muestra los perfiles de los histogramas, que representan la distribución de la expresión de los marcadores celulares CD3, CD4, CD8 y CD19 bajo diferentes condiciones de tratamiento: control (color verde), 10 µg/mL (color azul), 20 µg/mL (color rojo) y 100 µg/mL (color naranja). En los histogramas, el eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia, mientras que el eje Y muestra el recuento de células (Count) que exhiben dichas intensidades. Se observa un desplazamiento hacia la derecha en los marcadores CD3, CD4, y en menor intensidad en CD8 lo que sugiere una activación de estas células. Sin embargo, en el caso de CD19, no se observa un aumento en la expresión de las células B, responsables de la producción de anticuerpos.

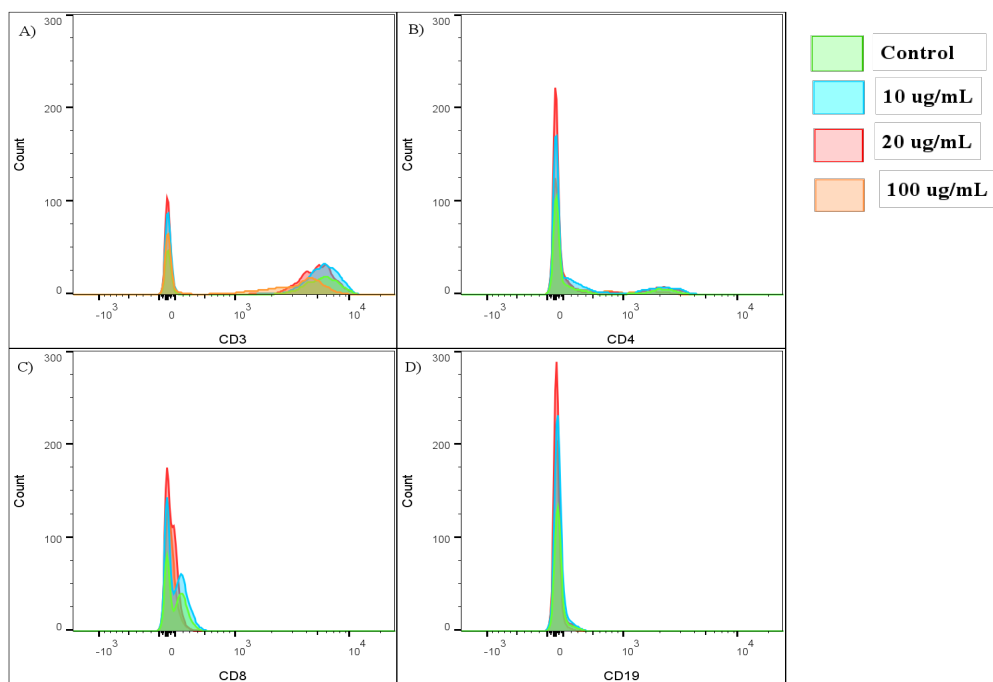


Figura 47 | Expresión de biomarcadores linfocitario tras exposición hoja de *Synsepalum dulcificum*. Representación de los perfiles de histograma de las frecuencias del fenotipo celular con relación a la expresión de biomarcadores.

5.3.5. Actividad aglutinante de hoja de *S. dulcificum*.

Con el objetivo de corroborar la seguridad alimentaria del extracto de semilla, como lo solicita la EFSA al ingresar alimento por primera vez en España, se trataron eritrocitos con extractos para observar posibles acciones hemaglutinantes o de hemólisis.

Como se observa en la **Figura 48**, el extracto de hoja provocó hemólisis en las diluciones más bajas, lo que corresponde a las concentraciones más altas del extracto. Esta acción se evidenció en los tres grupos sanguíneos evaluados (A, B y O). Específicamente, en los grupos sanguíneos A y O, la acción hemolítica disminuyó a partir de la dilución 1:8, mientras que en el grupo sanguíneo B, la disminución se observó también a partir de la dilución 1:28.

En el control negativo, que consistió en agua destilada, no se observaron agregados celulares visibles, lo cual confirma la lisis celular. Esto demuestra la acción hemolítica del control positivo, que provoca la ruptura de los eritrocitos y, por ende, la liberación de hemoglobina, evidenciando los efectos observados en las muestras tratadas con los extractos.

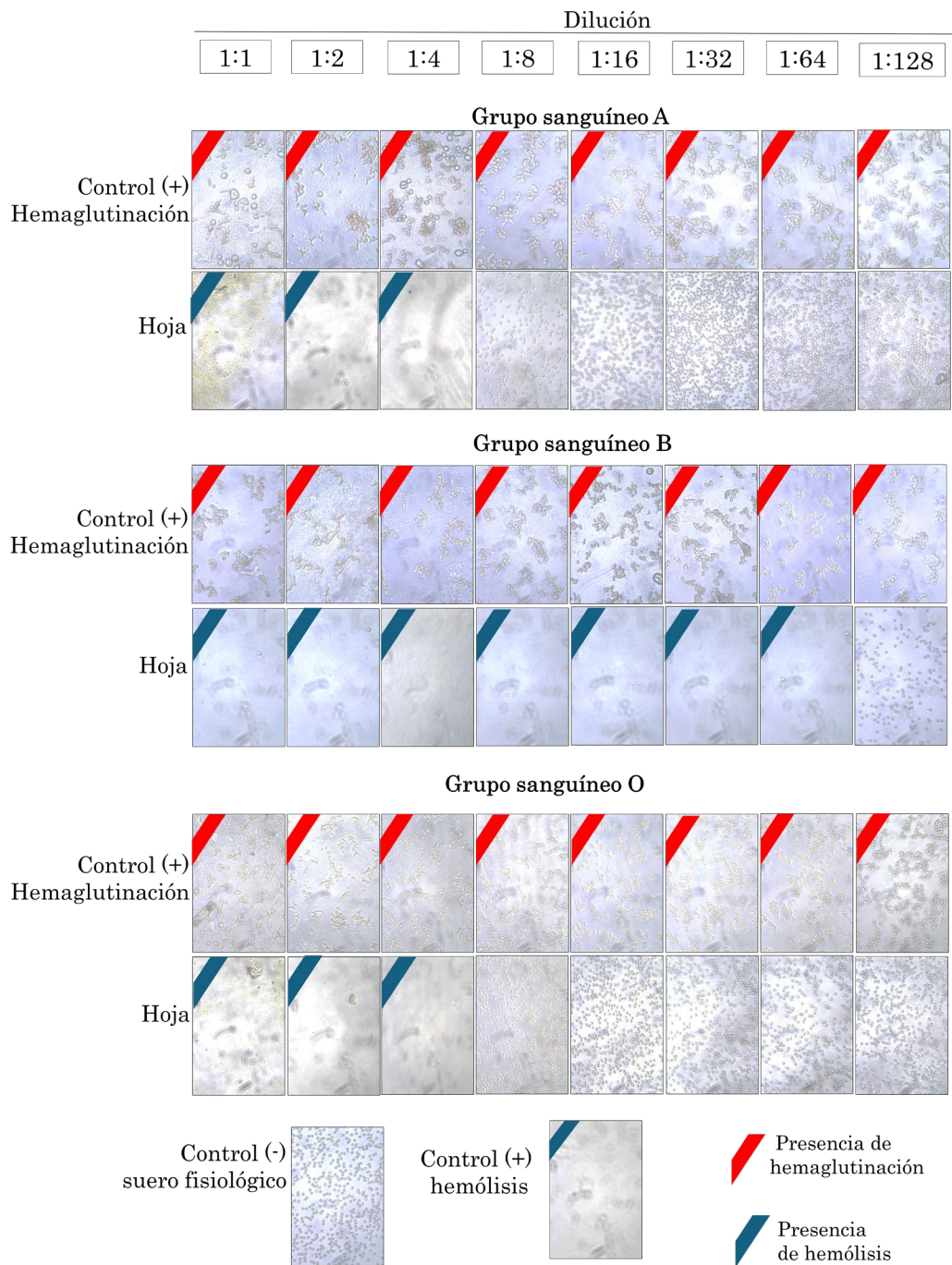


Figura 48 | Representación del grado de hemaglutinación de hoja de *Synsepalum dulcificum*. Micrografías a 200X muestran tres condiciones: extracto de judía pinta (control positivo), suero fisiológico (control negativo) y extracto de DMB®, diluidos en PBS 1X o agua. En la parte superior se observan diluciones seriadas (1:1 a 1:128). Cada condición se evaluó en grupos sanguíneos A, B y O (n=3), con tres fotos por ensayo y condición, capturando diferentes campos de visión. Las fotografías con marcas rojas indican $\geq 50\%$ de aglutinación, y las azules indican hemólisis.



5.4. Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES)

5.4.1. Obtención de miraculina de DMB® mediante NaDES.

Se obtuvieron extractos proteicos utilizando NaDES con el propósito de evaluar el aumento en la obtención de miraculina en comparación con un tampón (buffer) de extracción proteica. Se realizó un análisis mediante Western Blot para evaluar la cantidad de miraculina obtenida en cada extracto. La cuantificación relativa se llevó a cabo mediante densitometría con el software ImageJ .

En la **Figura 49**, se observan membranas de nitrocelulosa que contienen la proteína miraculina en forma de una banda de color negro. Las bandas correspondientes a miraculina (con un peso molecular aproximadamente de ~30 kDa) son visibles en la mayoría de las muestras. La intensidad de estas varía según el NaDES utilizado. El control interno de cada membrana se realizó con buffer de extracción proteica.

Los resultados se expresaron de manera relativa al control con el tampón de extracción. 13 de 31 NaDES extraen una cantidad de miraculina igual o superior al control, con el valor más alto con el NaDES 27 (Cloruro de colina:Glicina). La **Figura 50**, es una representación relativa de la cantidad de miraculina obtenida con cada uno de los NaDES respecto al control.

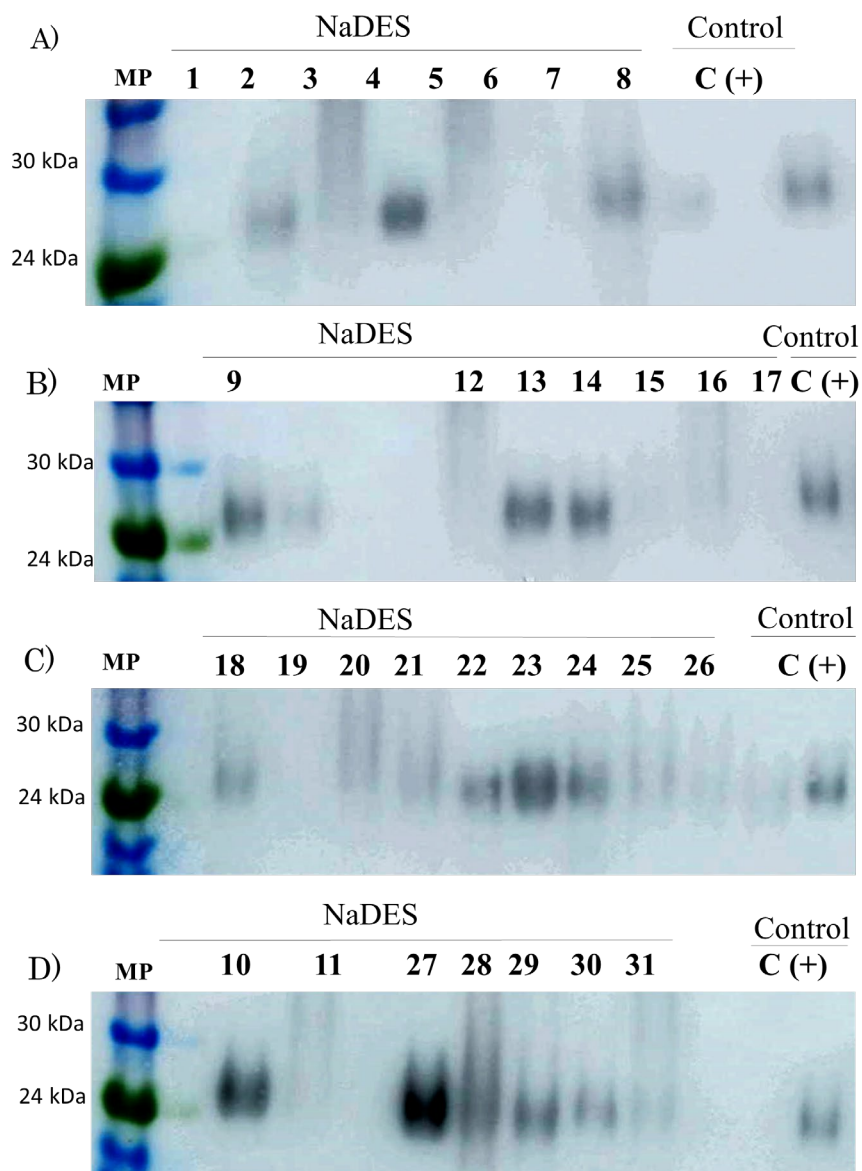


Figura 49 | Detección de miraculina en extracto de DMB® obtenidos con disolventes naturales eutécticos profundos (NaDES). Membrana de nitrocelulosa obtenida mediante la técnica Western Blot. A) NaDES 1 al 8. B) NaDES 9-12-13-14-15-16-17. C) NaDES 18 AL 26. D) NaDES 10-11 y 27 al 31. La proteína miraculina se muestra mediante una banda de color negro correspondiente a un tamaño de ~30 kDa. Cada fila representa una repetición independiente del experimento. La intensidad de las bandas depende del NaDES utilizando, indicando una mayor extracción de miraculina. MP, corresponde al marcador de pesos moleculares; C (+), control con el tampón (buffer) proteico. Se trata de una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

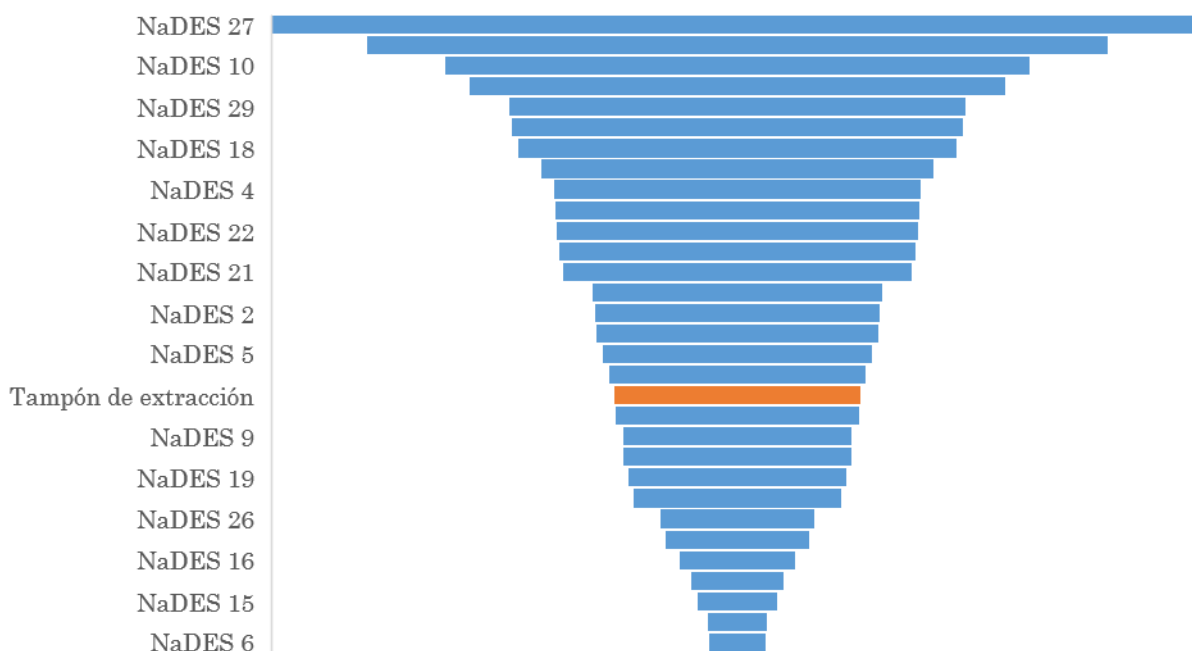


Figura 50: Rendimiento de extracción de la proteína miraculina mediante Disolventes naturales eutécticos profundos. Diagrama de barras (embudo) que muestra el valor relativo de miraculina obtenida con los distintos NaDES (color azul), utilizando el control positivo C (+) como referencia al 100% (color naranja).

5.4.2. Obtención de compuestos con capacidad antioxidante de DMB® mediante NaDES.

Se obtuvieron compuestos con capacidad antioxidante utilizando disolventes naturales eutécticos profundos (NaDES) para evaluar la capacidad antioxidante extraída en DMB® en comparación con el etanol al 70% con el objetivo de aumentar el rendimiento de obtención de estos compuestos. Se realizó un análisis de varianza mediante ANOVA de una vía para comparar los grupos, indicando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control etanol al 70%.

Como se observa en la **Figura 51**, el valor máximo se obtiene con el disolventes etanol al 70% (102 μmol trolox/ g PS), sin embargo, no se aprecian diferencias con respecto a 16 de los 31 NaDES estudiados. Entre estos, destacan los NaDES 24

alcanzando un valor de 97,57 $\mu\text{mol trolox/ g PS}$, seguido por el NaDES 27 con 84,56 $\mu\text{mol trolox/ g PS}$ y el NaDES 4 con 80 $\mu\text{mol trolox/ g PS}$.

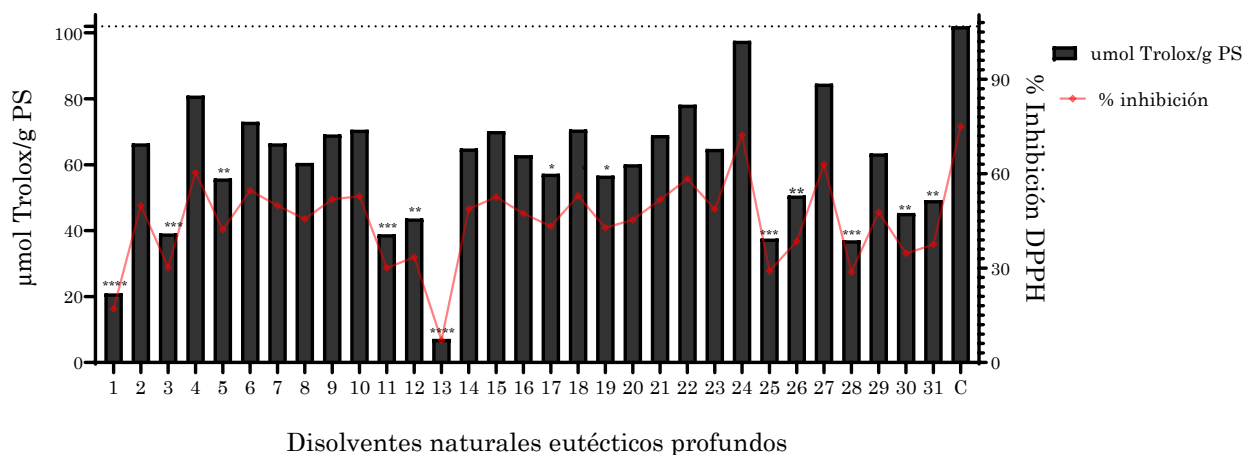


Figura 51 | Efecto de los disolventes naturales eutécticos profundos sobre la capacidad antioxidante de DMB®. El gráfico de barra representa la capacidad antioxidante obtenida de DMB® evaluada mediante la técnica DPPH. Los resultados se expresan en μmol equivalentes a trolox por gramo de materia seca. El gráfico de punto equivale al porcentaje de inhibición al radical DPPH. Se utilizó ANOVA de una vía para comparar los grupos, indicando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control etanol al 70% (C) mediante asteriscos superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).



5.5. Uso de aprendizaje automático para la obtención de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante mediante los disolventes NaDES

Se llevaron a cabo análisis utilizando dos bases de datos: una centrada en las propiedades nutricionales y otra en el porcentaje de inhibición al radical DPPH de los compuestos fenólicos obtenidos con los distintos NaDES. Se aplicaron técnicas de clúster, tanto mediante K-medias como agrupación jerárquica, para identificar patrones en las dos bases de datos. A continuación, se presenta un esquema de cómo se estructuraron los resultados obtenidos. En general, los resultados muestran una correlación entre la composición nutricional de las frutas y su capacidad antioxidante y, por otro lado, se destaca la efectividad de los disolventes NaDES y Etanol al 70% en la extracción de compuestos bioactivos (**Figura 52**).

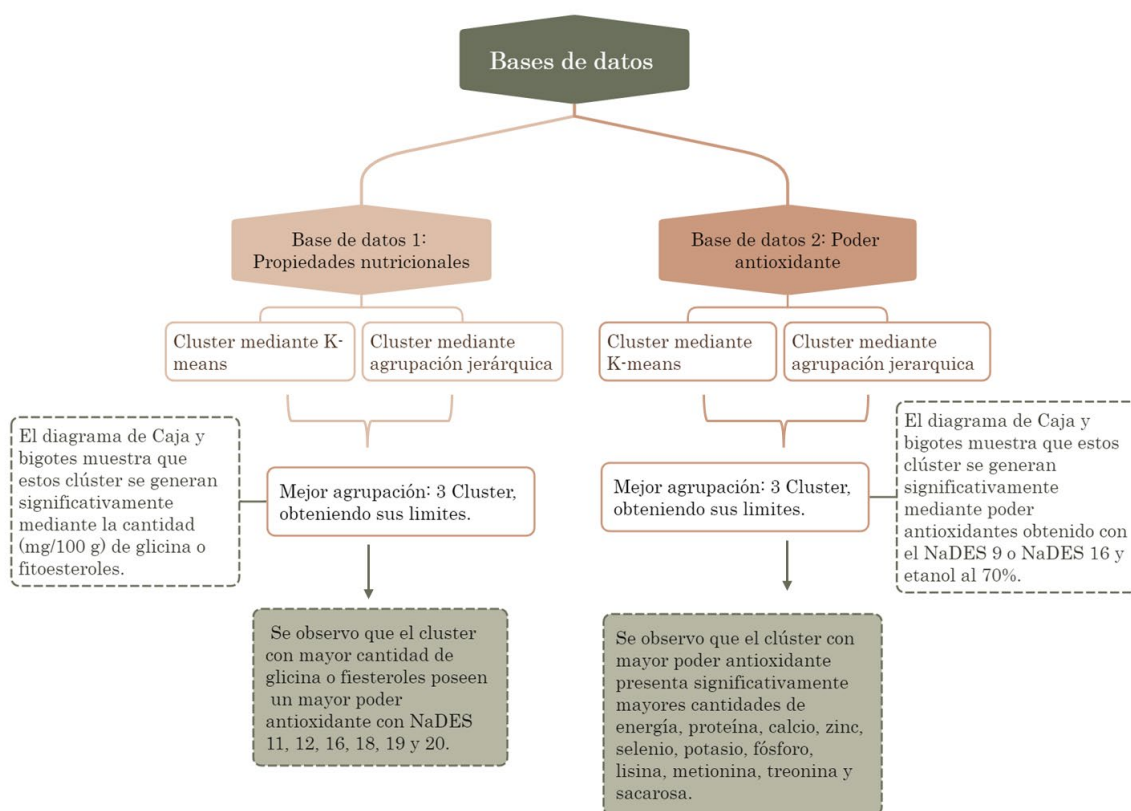


Figura 52| Resumen de análisis de clústeres de dos bases de datos: propiedades nutricionales y capacidad antioxidante. Se muestra la agrupación de datos mediante K-medias y agrupación jerárquica, resultando en tres clústeres con sus límites. En la base de datos 1, se observó que el clúster con mayor cantidad de glicina o fiesteroles presenta una mayor capacidad antioxidante con NaDES 11, 12, 16, 18, 19 y 20. En la base de datos 2, se observó que el clúster con mayor capacidad antioxidante presenta significativamente mayores cantidades de energía, proteína, calcio, zinc, selenio, potasio, fósforo, lisina, metionina, treonina y sacarosa.

5.5.1. Bases de datos

Se crearon dos bases de datos para el análisis predictivo. La primera corresponde a una recopilación de 69 parámetros nutricionales de las 30 frutas evaluadas en este estudio. Sin embargo, se eliminaron 5 frutas debido a la falta de información necesaria para el modelamiento matemático, de las cuales fueron guaraná, maqui, arrayan, pitaya, y tuna.

La segunda base de datos contiene la capacidad antioxidante de 30 frutas obtenida mediante los disolventes NaDES. Estos resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del radical DPPH, incluyendo el disolvente etanol al 70% como control de disolvente convencional.

Las bases de datos obtenidas se representan en el esquema de la **Figura 53**. Las bases de datos completas se encuentran en los **Anexo 1** y **Anexo 2**.

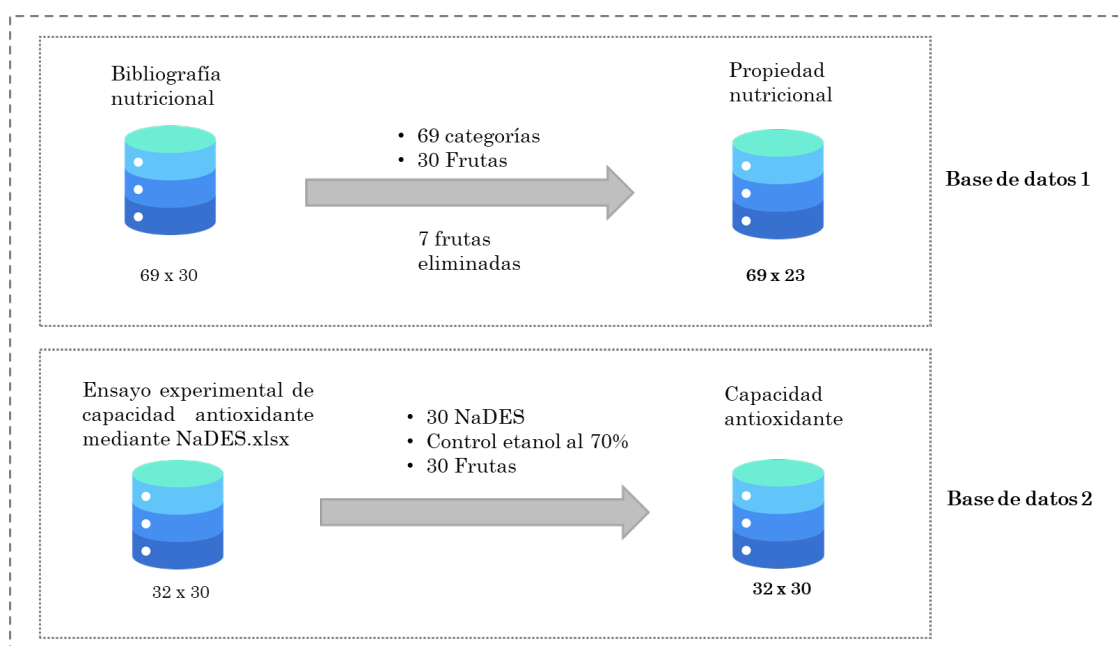


Figura 53 | Bases de datos utilizados en el estudio. Esquema del proceso de selección de datos para la elaboración de bases de datos. La primera base (arriba) representa la recopilación y selección de los datos obtenido mediante bibliografía. La segunda base (abajo) muestra el proceso de selección de los datos obtenido y recopilados en el laboratorio.

5.5.2. Predicción de la capacidad antioxidante de los fenoles obtenidos mediante los NaDES a partir de las características funcionales de las frutas

Se realizaron los análisis de las bases de datos mediante algoritmos de aprendizaje automático supervisado, con el objetivo de predecir la capacidad antioxidante que obtiene un NaDES de una fruta conociendo sus características funcionales. Es decir, se estudiaron diferentes algoritmos de regresión para predecir un valor numérico. Para realizar dicho análisis, se juntaron las dos bases de datos.

En la **Tabla 13**, se muestra el análisis de las dos bases de datos implementando los 6 modelos de regresión: SVM, Random Forest, kNN, árbol de decisión (Tree), Stochastic Gradient Descent y Regresión Lineal. Aunque ninguno de los modelos presenta una buena precisión en el ajuste (**Figura 54**) el modelo Random Forest presentó el mejor ajuste donde el coeficiente de R^2 mostró un valor de 0.547.

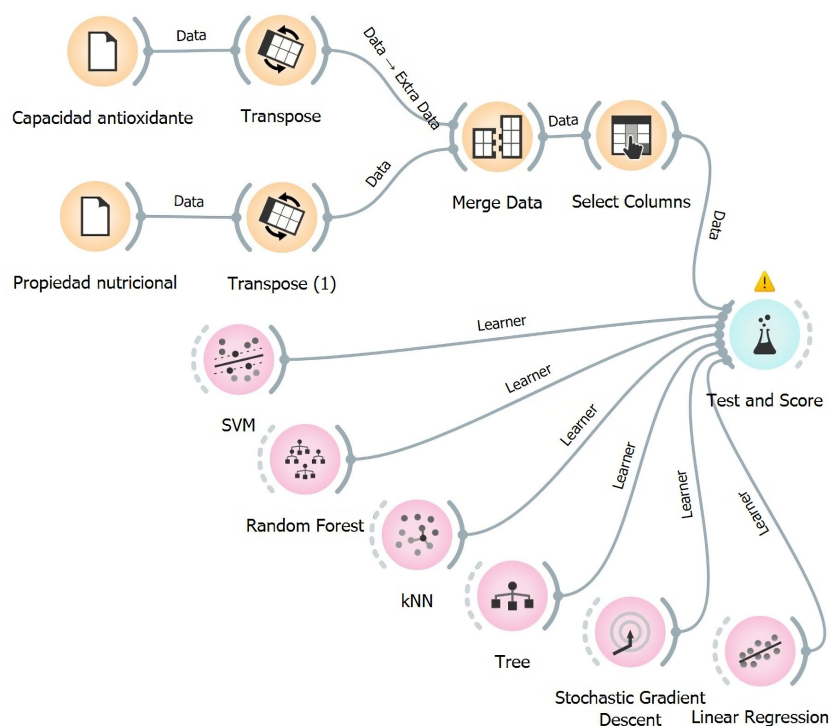


Figura 54 | Algoritmos de aprendizaje supervisado utilizados mediante el programa Orange3. Imagen representativa del entorno de desarrollo integrado utilizado para la evaluación de las bases de datos.

Tabla 13 | Evaluación de los modelos supervisados utilizados en este estudio.

Modelo	Posición	Métricas de precisión			
		MSE	RMSE	MAE	R ²
Random Forest	1	462.066	21.296	16.148	0.547
Tree	2	679.189	26.061	20.061	0.334
kNN	3	1064.818	32.632	22.874	-0.044
SVM	4	1351.66	36.765	29.824	-0.325
Linear Regressi	5	2378.069	48.765	28.767	-1.332
SGD	6	9296.145	96.417	37.053	-8.116

5.5.3. Agrupación (clustering) de frutas

En el apartado anterior se observa que no se puede predecir con suficiente precisión la capacidad antioxidante de los fenoles que se obtiene mediante los NaDES a partir únicamente de las características funcionales de las frutas. Motivo por el que se ha decidido realizar un nuevo enfoque. Se estudió la posible agrupación de las frutas según sus propiedades nutricionales, por un lado, y en función de sus capacidades antioxidantes de los fenoles obtenido mediante los NaDES, por otro. Estas agrupaciones se realizaron mediante el aprendizaje automático no supervisado.

Uno de los problemas que suele estudiar el aprendizaje automático no supervisado se conoce en inglés como “clustering”, y para nuestro estudio se han utilizado los algoritmos K-medias (K-mean) y agrupación jerárquica (Hierarchical clustering). El análisis y valores de estas agrupaciones fueron evaluadas mediante el diagrama de bigotes y cajas (Box plot).

En este contexto, como se ha explicado anteriormente, el índice de silueta (valor dado por el algoritmo K-medias en nuestro estudio) entrega valores -1 y 1, donde valores cercanos a 1 sugieren que los puntos de datos están adecuadamente agrupados dentro de su respectivo clúster, valores cercanos a 0 indican que los puntos están en el límite de dos clústeres, y valores negativos indica que los puntos de datos pueden estar incorrectamente agrupados, dado que se encuentran más próximos a los puntos pertenecientes a un clúster diferente que a los de su propio clúster.

ii. **Agrupación (clustering) de frutas mediante sus propiedades nutricionales**

Para la base de datos 1, que contiene las propiedades nutricionales de las frutas, los valores de silueta fueron similares, aunque los valores más altos se encontraron para 5 clústeres con un valor de 0.366 (**Tabla 14**). Sin embargo, también se encontraron valores similares para 2 clústeres con 0.358, distribuidos en 7 y 17 frutas (**Figura 55 A**); Para tres clústeres un valor de 0.362, distribuidos en 2, 5 y 16 frutas (**Figura 55 B**) y para cuatro clústeres un valor de 0.362, distribuidos en 1, 2, 4 y 16 frutas (**Figura 55 C**).

Por otro lado, mediante el algoritmo de agrupación jerárquica se obtuvieron datos en un dendrograma, lo cual, ha permitido visualizar los componentes que conforman cada clúster (**Figura 56**). Se observa una distribución homogénea de las frutas para una agrupación mediante dos clústeres P1 (color rojo) y P2 (color verde) (**Figura 56 A**). Para el caso de tres clústeres, se identificaron que el grupo P1 (color rojo) está constituido por la mayoría de las frutas, P2 (color azul) está constituido por dos frutas, dátil y lúcuma (P2), y el último grupo P3 (color verde) con cinco frutas: uchuva (Golden berry), acai, aguacate, guaraná y maqui (P3) (**Figura 56B**). Mientras que, al aumentar a cuatro clústeres, se mantiene la distribución anterior, con la diferencia que el cuarto clúster (P4) se conforma solamente de fruta uchuva (Golden Berry) (**Figura 56C**).

Tabla 14 | Valores de K-medias de frutas en función de sus propiedades nutricionales

K-medias	Número de Grupos						
	2	3	4	5	6	7	8
	0.358	0.362	0.362	0.366	0.365	0.354	0.339

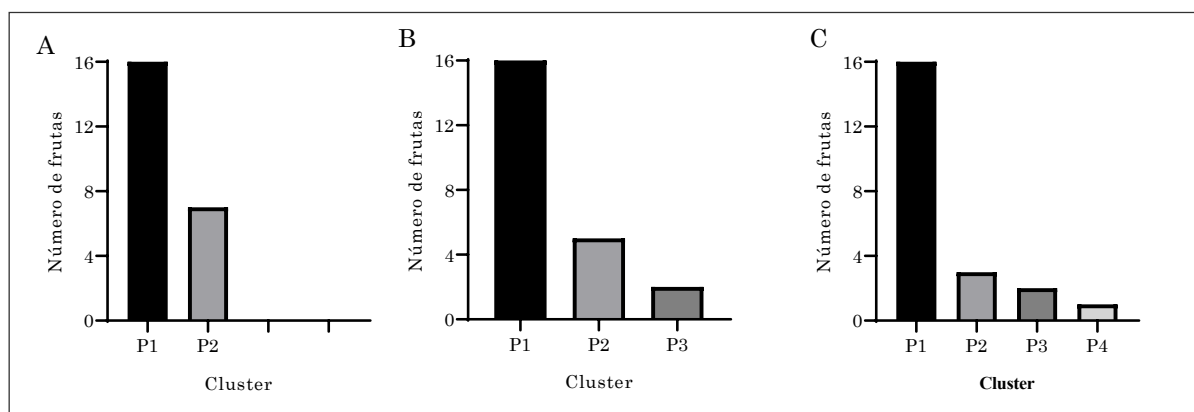


Figura 55 | Distribución de los distintos grupos de frutas en función de sus propiedades nutricionales mediante el algoritmo K-medias. Distribución generada mediante el algoritmo K-medias, donde cada grupo está representado por la etiqueta (P), el cual corresponde a las agrupaciones generadas por el programa orange3: (A) dos grupos (B) tres grupos (C) cuatro grupos.

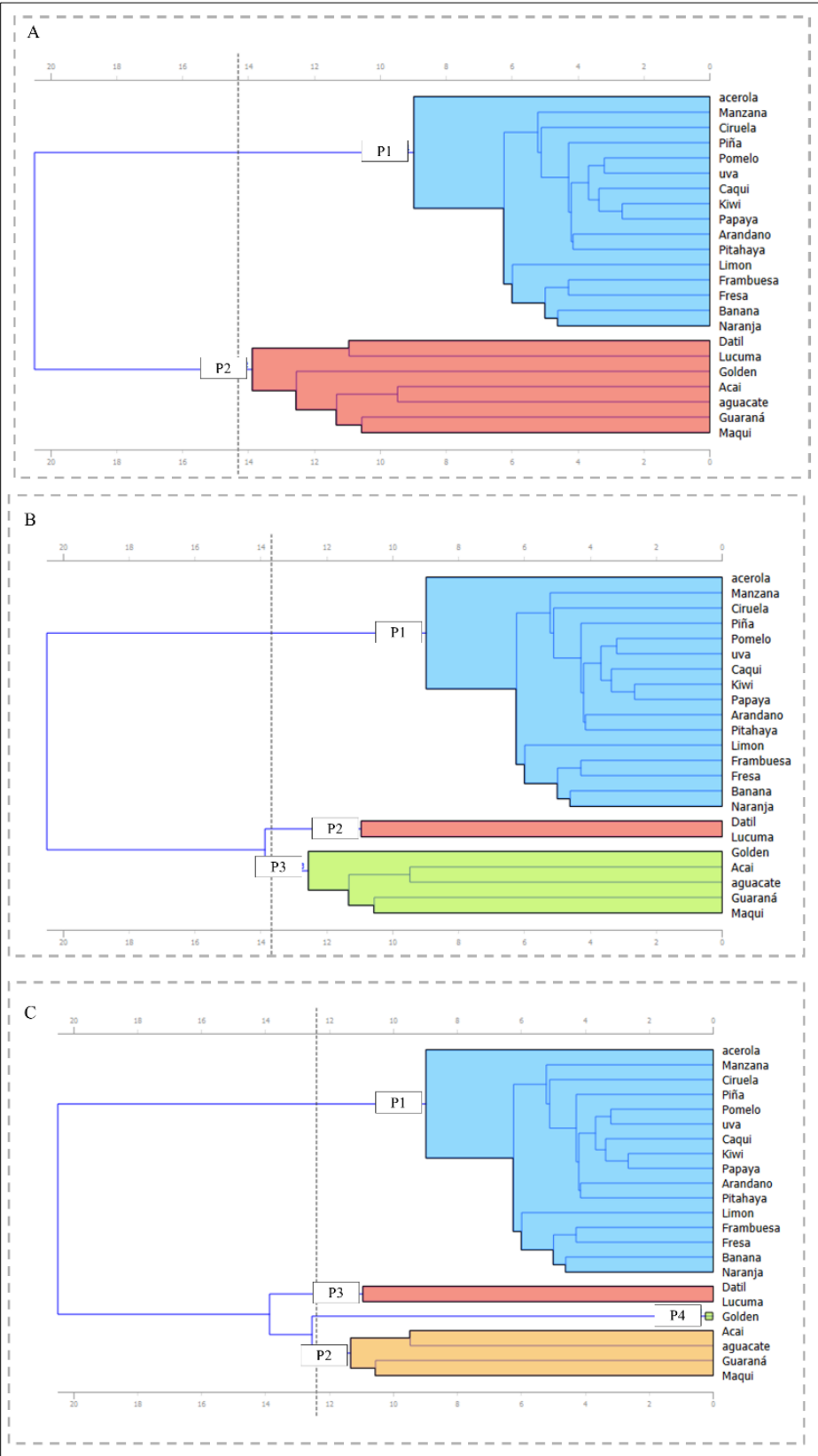


Figura 56 | Agrupación jerárquica de las frutas en función de sus propiedades nutricionales. Clústeres generados con el algoritmo de agrupación jerárquica mediante el software orange3. Los clústeres se representan con la etiqueta “P”, donde se observa la distribución de las frutas con (A) dos clusters, (B) tres clústeres y (C) cuatro clústeres.

Aunque el valor más alto del índice de silueta se observa en el caso de la agrupación en cinco clústeres (**Tabla 14**), a partir del cuarto clúster, cada uno de ellos comienza a estar constituido por una única fruta. Esta situación dificulta la justificación de una comparación significativa entre los clústeres, ya que, al estar formados por un solo elemento, no cumplen con el objetivo de agrupar con características similares. Por lo tanto, la interpretación de estos resultados pierde relevancia en términos de análisis comparativo entre grupos. Por este motivo, para los análisis posteriores se escogió la distribución generada con 3 clústeres.

Posteriormente, a partir del dendrograma, los datos fueron analizados mediante el diagrama de cajas y bigotes. Esta forma de visualizar los datos se observó los límites, media y valores atípicos de cada clúster y los parámetros más relevantes (componentes) que generaban cada clúster.

Los compuestos glicina y fitoesteroles mostraron tener más relevancia en la distribución de los tres clústeres utilizando el diagrama de caja y bigotes (Boxplot) (**Figura 57**). Para la agrupación generada según la cantidad de fitoesteroles, el análisis de varianza (ANOVA) mostró un valor de 54,9 con una P menor de 10^{-4} . El clúster P1 mostró valores entre 0 a 0,5 mg; 12 a 18 mg para el clúster P2 y 10 a 111 mg para el clúster P3 (**Figura 57 A**). Los clústeres generados según la cantidad de glicina mostraron un análisis de varianza (ANOVA) de 34,27 también con valor de P menor de 10^{-4} . El clúster P3 mostró los valores más bajo de glicina, entre 0 y 30 mg (P3), 50 a 90 mg para el clúster P1, y 135 mg a 170 mg para el clúster P2 (**Figura 57B**).

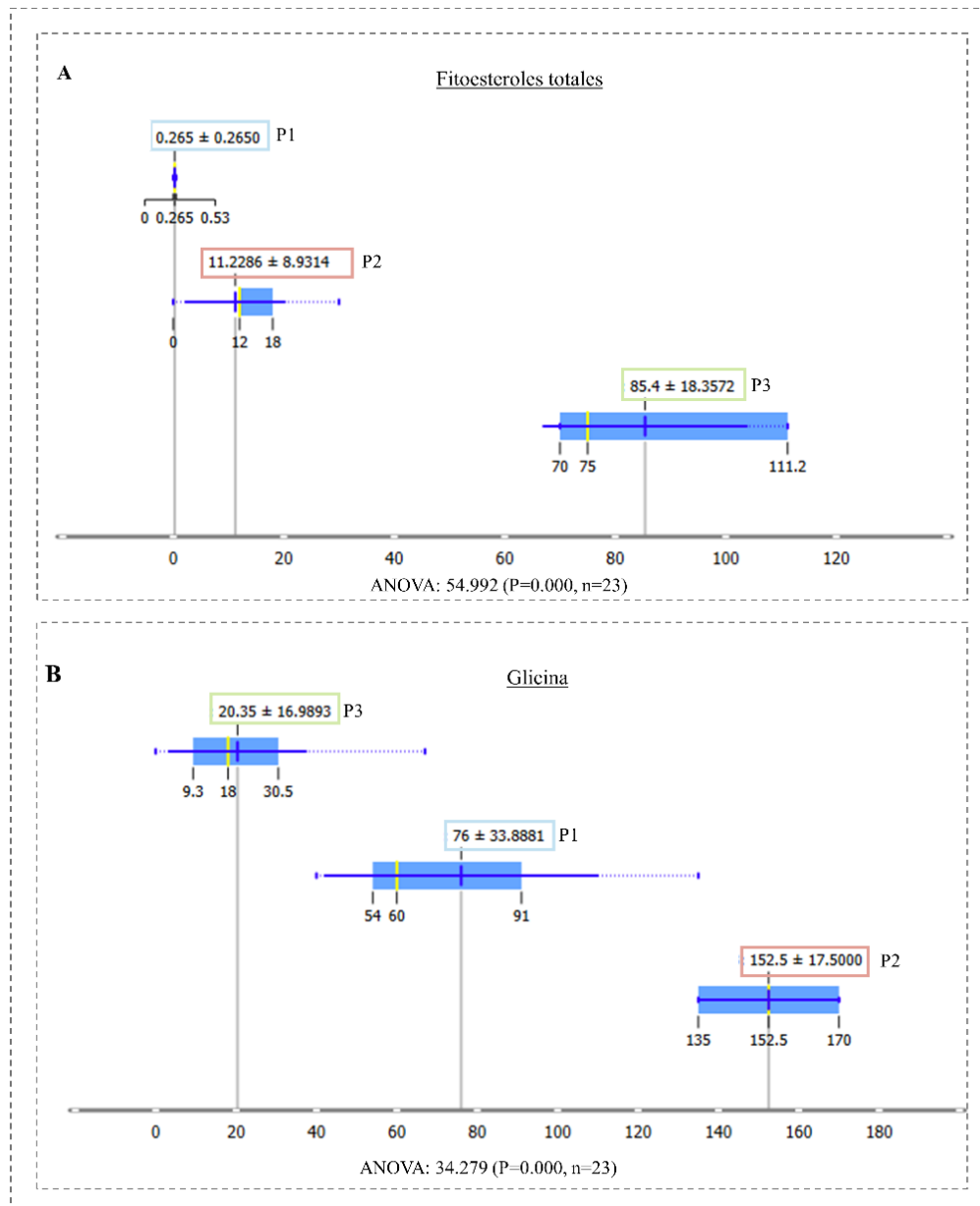


Figura 57 | Distribución de las frutas según la cantidad de fitoesteroides y glicina utilizando el diagrama de caja y bigotes (Boxplot). (A) Fitoesteroides totales [mg/100g]: Los valores medios y la dispersión de los fitoesteroides totales se presentan para los tres Clústeres (P1, P2 y P3), mostrando diferencias significativas entre ellos (ANOVA: 54.992, p menor de 10^{-4}). (B) Glicina[mg/100g]: Los valores medios y la dispersión de la glicina se presentan para los tres clústeres (P1, P2 y P3), mostrando también diferencias significativas entre ellos (ANOVA: 34.279, P menor de 10^{-4}). Las cajas representan el rango intercuartil (IQR) de los datos, las líneas dentro de las cajas indican la mediana, y los bigotes se extienden hasta los valores mínimos y máximos que no son considerados valores atípicos.

Los resultados de los análisis de los clústeres basados en las concentraciones de glicina y fitoesteroles se representaron mediante un gráfico de dispersión (**Figura 58**). El clúster P1 (color azul) que está constituido por la mayoría de las frutas tiende a agruparse por sus niveles bajo y medio de glicina y fitoesteroles, respectivamente. El clúster P2 (color rojo,) que está constituido por dátil y lúcumá, se caracteriza por poseer alta y media cantidad de glicina y fitoesterol. Por otro lado, el clúster 3 P3 (color verde) que está constituido uchuva (golden Berry), acai, aguacate, guaraná y maqui, muestras altas cantidades de glicina y baja cantidad de fitoesterol.

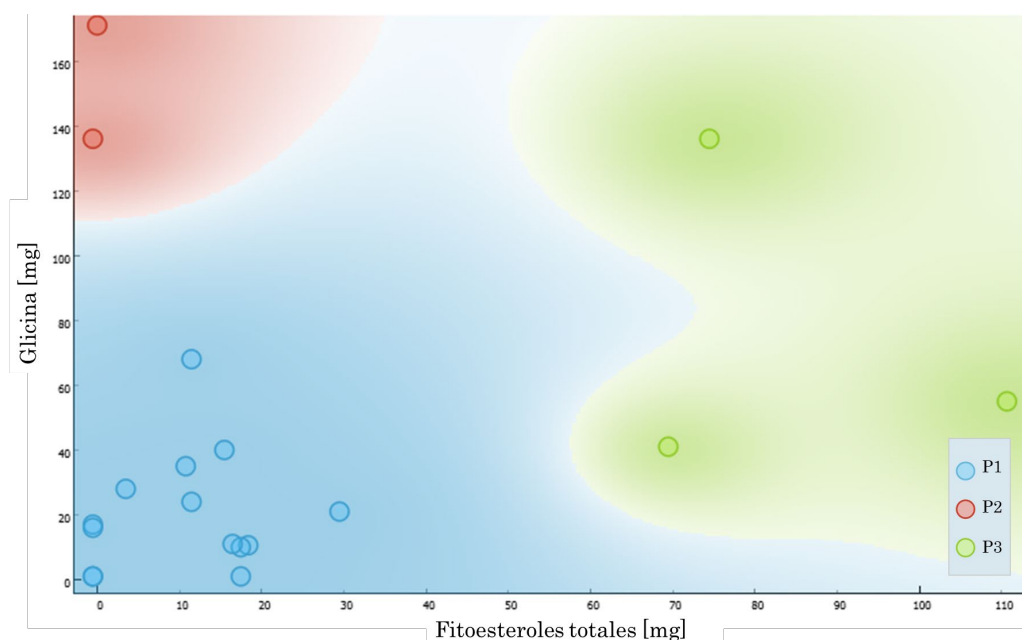


Figura 58 | Gráfico de dispersión de las frutas según la cantidad de fitoesteroles y glicina.

Los puntos representan las frutas y están coloreados según su pertenencia a uno de los tres Clústeres (P1 en azul, P2 en rojo y P3 en verde) distribuidos mediante agrupación jerárquica. Los contornos de color muestran las regiones de influencia de cada clúster en el espacio de las dos variables nutricionales: fitoesteroles totales (mg) y glicina (mg). Se observa que cada clúster ocupa una región distinta, indicando diferencias significativas en las cantidades de fitoesteroles y glicina entre los grupos.

Las frutas fueron agrupadas en clústeres basados en sus propiedades nutricionales, identificando la glicina y los fitoesteroles como los compuestos más relevantes en dichos agrupamientos. Posteriormente, con el propósito de saber si estos clústeres poseen diferencias significativas con respecto a su capacidad de inhibir el radical DPPH (capacidad antioxidante) se llevó a cabo un análisis de varianza realizando pruebas post hoc de Duncan (DMS). Este análisis se realizó con cada uno de los diferentes disolventes empleado en este estudio.

El análisis mostró que el clúster P3 (color verde), caracterizado por su alto contenido de fitoesteroles, exhibe una capacidad antioxidante significativamente superior con los disolventes NaDES 3, 11, 12, 16, 18, 19, 20, 21, 31 y etanol al 70% en comparación con los clústeres P1 y P2, que son frutas con bajo y medio capacidad antioxidante (**Figura 59**).

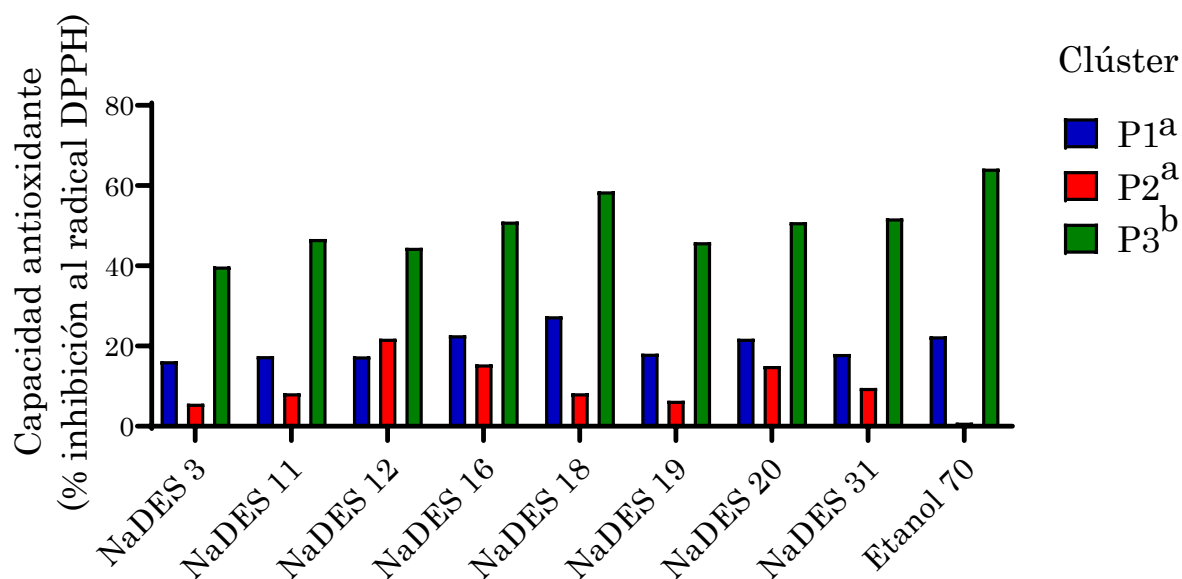


Figura 59 | Capacidad antioxidante de diferentes frutas agrupadas según su composición de Glicina y Fitoesteroles. En color azul se representan las frutas que posee bajas cantidades de glicina y fitoesteroles. En color rojo, se muestran las frutas que presentan una cantidad media de glicina y fitoesteroles, mientras que en color verde se indican las frutas con alta cantidades de glicina y fitoesteroles.

iii. Agrupación (clustering) de frutas mediante porcentaje de inhibición al radical DPPH obtenido con NaDES.

Del mismo modo, se han realizados clústeres la base de datos 2, que contiene la capacidad antioxidante de las frutas que fueron capaces de obtener los NaDES.

Los valores de silueta más altos se encontraron para 2 clústeres con 0.468 (Tabla 15) distribuidos en 7 y 23 frutas y tres clústeres con un valor de 0.400, distribuidos en 3, 12 y 15 frutas (Figura 60)

Tabla 15 | Valores de K-medias de las frutas en función de su capacidad antioxidante obtenida mediante disolventes eutécticos profundos

	Número de Grupos						
	2	3	4	5	6	7	8
K-means	0.468	0.4	0.333	0.342	0.287	0.301	0.292

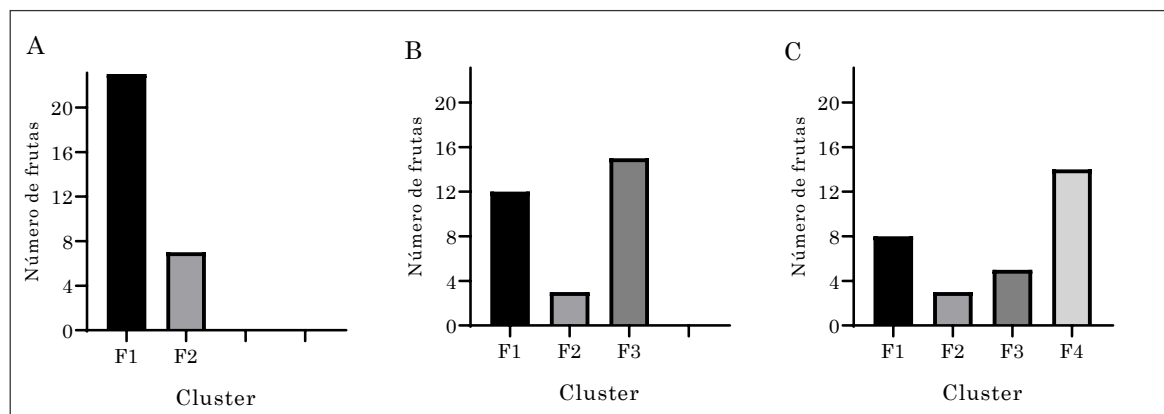


Figura 60 | Distribución de los distintos grupos de frutas en función de su porcentaje de inhibición al radical DPPH mediante el algoritmo K-medias. Distribución generada mediante el algoritmo K-medias, donde cada grupo está representado por la etiqueta (F), el cual corresponde a las agrupaciones generadas por el programa orange3: (A) dos clústeres (B) tres clústeres (C) cuatro Clústeres.

En la **Figura 61**, se puede observar las frutas que componen cada clúster generado. Para dos clústeres observó una distribución homogénea de las frutas F1 (color azul) y F2 (color rojo) (**Figura 61 A**). Para tres clústeres, se identificaron dos grupos constituidos por la mayoría de las frutas: F1(color azul) y F3 (color verde) (**Figura 61B**), y el grupo F2 (color rojo) está constituido solo por tres frutas: arándano, guaraná y maqui (**Figura 61C**).

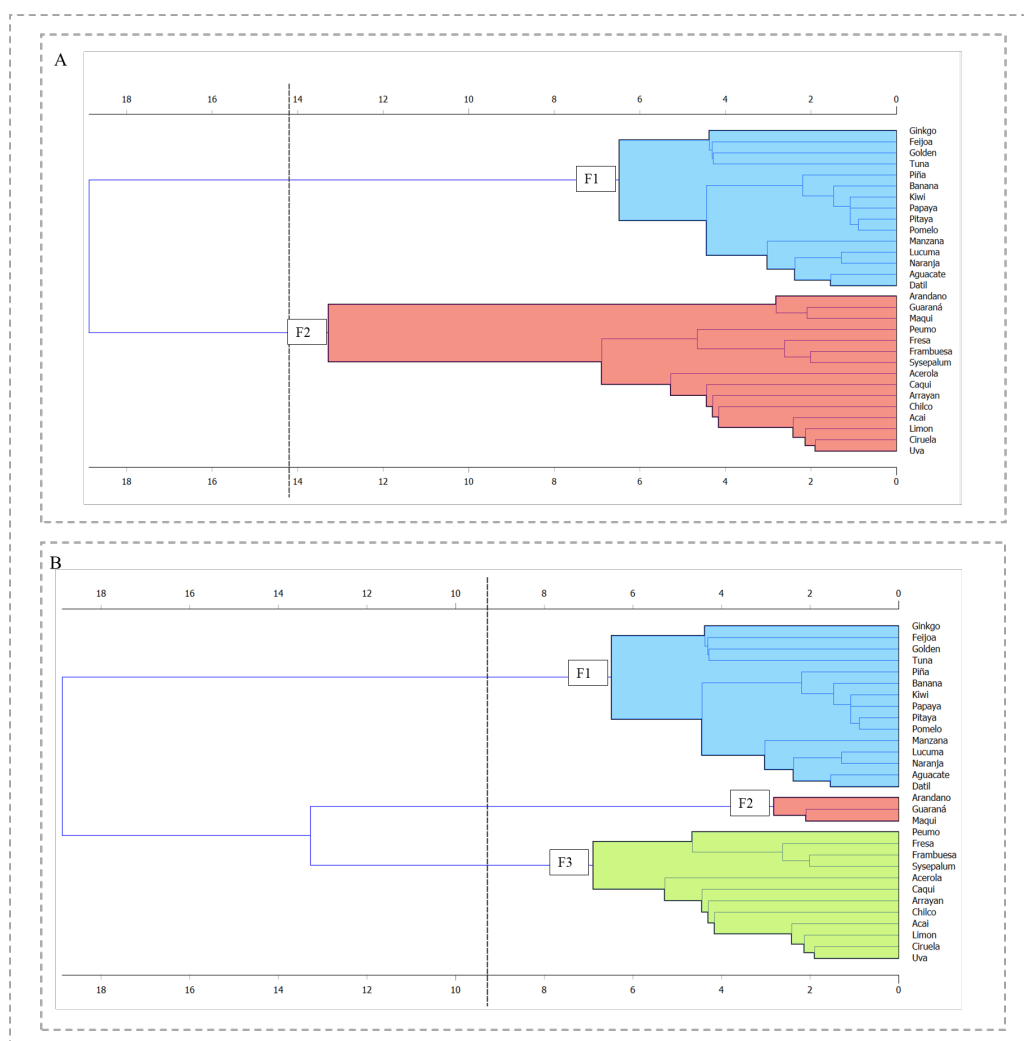


Figura 61 | Agrupación jerárquica de las frutas en función de su porcentaje de inhibición al radical DPPH de los compuestos obtenidos mediante NaDES. clústeres generados con el algoritmo de agrupacion jerárquica mediante el software orange3. Los clústeres se representa con la etiqueta “F”, donde se observa la distribución de las frutas según la capacidad antioxidante (porcentaje de inhibición de DPPH) mediante NaDES, con (A) dos cluster, (B) tres clústeres.

Si bien el valor más alto del índice de silueta se obtuvo al agrupar los datos en dos clústeres (**Tabla 15**), se ha optado por realizar los análisis futuros utilizando una agrupación en tres clústeres. Al analizar las frutas pertenecientes a cada clúster (**Figura 61**), se observó que las frutas arándano, guaraná y maqui se agruparon en un tercer clúster. Desde una perspectiva analítica, estas frutas son reconocidas en la literatura científica por su alta capacidad antioxidante y nos pueden proporcionar información en términos de sus propiedades bioquímicas. Motivo por el que los futuros análisis se realizaron con la agrupación de tres clústeres.

Mediante el diagrama de caja y bigotes los disolventes NaDES 9 y NaDES 16 mostraron tener más relevancia en la agrupación de las frutas en los tres clústeres. La agrupación de estos clústeres muestra una varianza (ANOVA) de 141,87 y 128,89, respectivamente. Ambos con un valor de p menor de 10^{-4} (**Figura 62**). Los rangos de capacidad antioxidante (% de inhibición del radical DPPH) para los clústeres fueron aproximadamente: clúster F1 (color azul) de 5% a 15%, clúster F2 (color rojo) de 74% a 90% y clúster F3 (color verde) de 29% a 50%, pudiéndose considerar valores bajos, medio y alta capacidad antioxidante. Se comprobó que ambos disolventes generaban la misma distribución de las frutas, lo que sugiere que no hay diferencias significativas en la extracción de compuestos de las frutas entre los dos disolventes utilizados. Al observar en que clúster pertenece la fruta *S. dulcificum* se puede ver que pertenece al clúster F3 (color verde) catalogado como capacidad antioxidante medio.

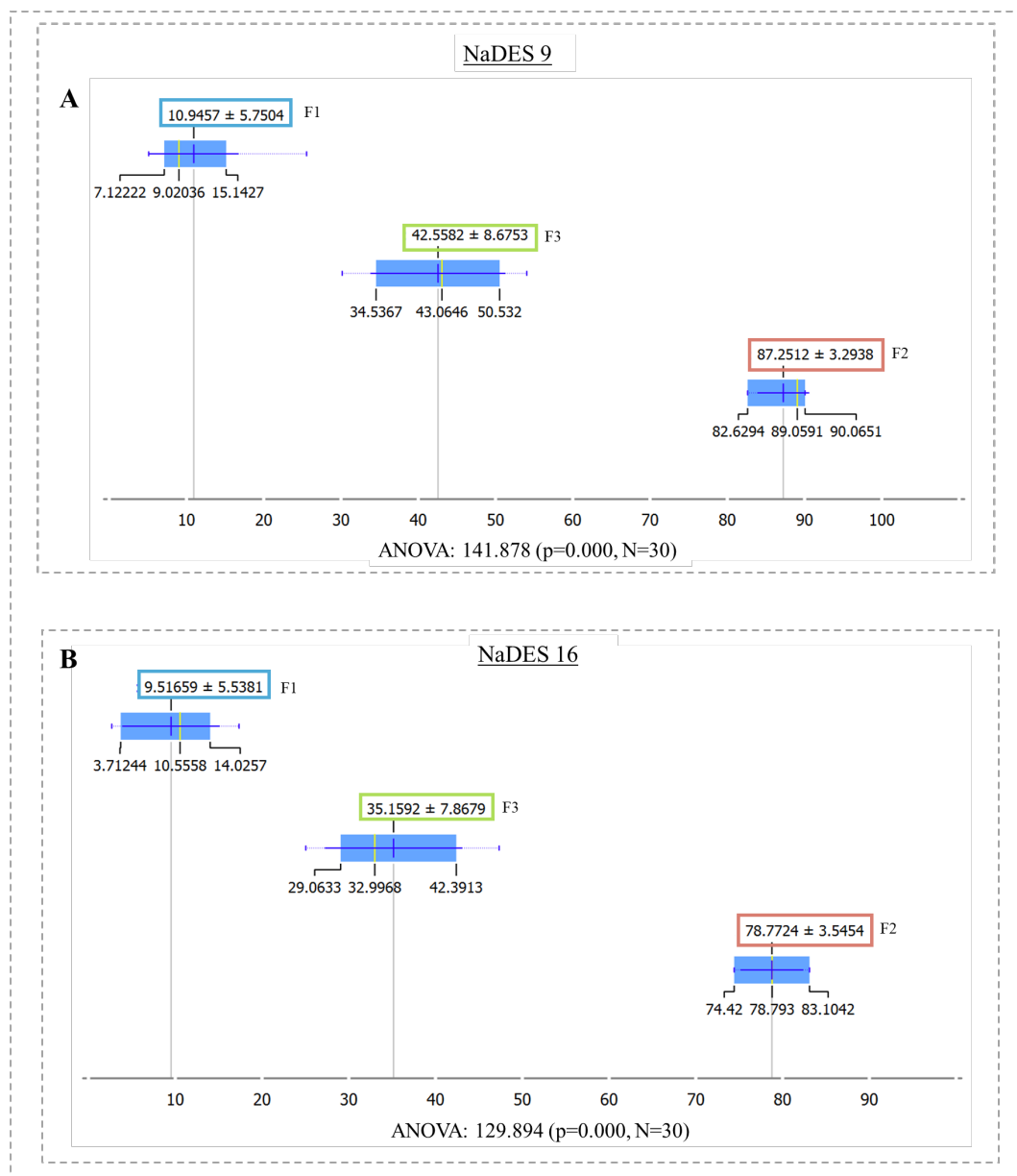


Figura 62 | Distribución de las frutas según el porcentaje de inhibición al radical DPPH obtenida mediante NaDES 9 y NaDES 16. (A) Capacidad antioxidante obtenido con NaDES 9: Los valores medios y la dispersión de la capacidad antioxidantes se presentan para los tres clústeres (F1, F2 y F3), mostrando diferencias significativas entre ellos (ANOVA: 141, p menor de 10^{-4}). (B) Capacidad antioxidante obtenido con NaDES 16: Los valores medios y la dispersión de la capacidad antioxidante se presentan para los tres clústeres (F1, F2 y F3), mostrando también diferencias significativas entre ellos (ANOVA: 129, p menor de 10^{-4}). Las cajas representan el rango intercuartil (IQR) de los datos, las líneas dentro de las cajas indican la mediana, y los bigotes se extienden hasta los valores mínimos y máximos que no son considerados valores atípicos.

Los resultados de los análisis de los clústeres basados en el porcentaje de inhibición de radical DPPH de los compuestos fenólicos obtenidos con los NaDES 9 y NaDES 16 se representaron mediante un gráfico de dispersión. Los clústeres de las frutas obtenidos mediante los NaDES 9 y NaDES 16 también se visualizaron mediante el gráfico de dispersión. El grupo F1 (color azul) tiende a agruparse por sus niveles bajo de capacidad antioxidante, el grupo F3 (color verde) posee una capacidad antioxidante moderada, y el grupo F2 (color rojo) muestra alta capacidad antioxidante (**Figura 63**).

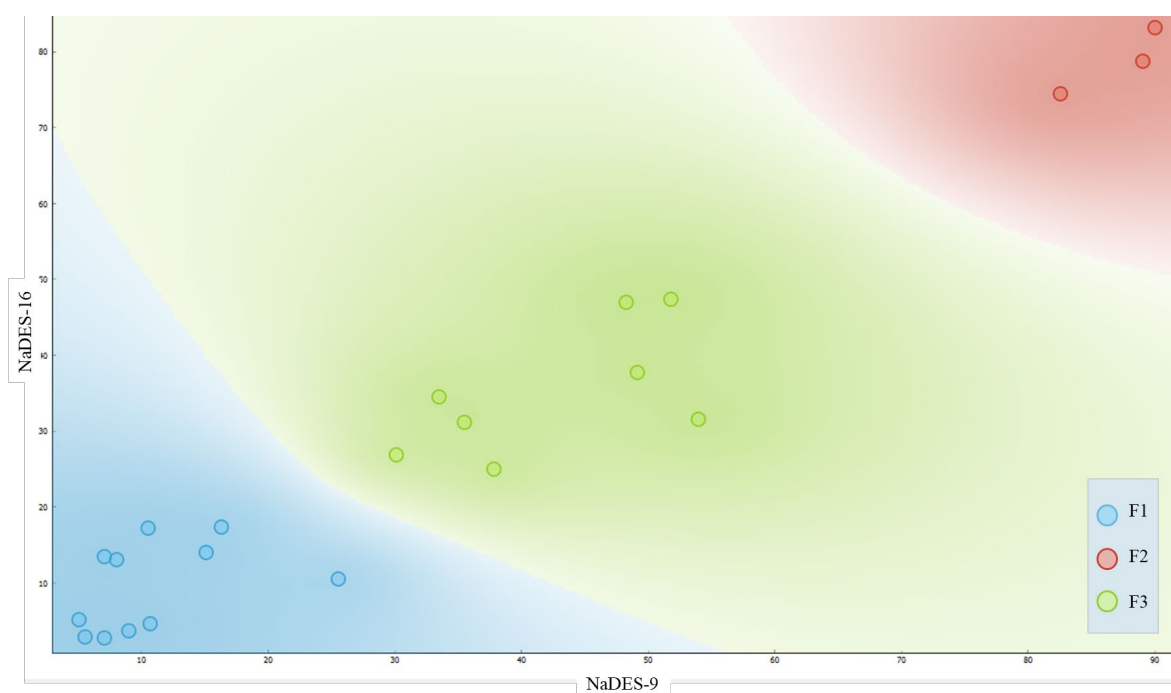


Figura 63 | Gráfico de dispersión de las frutas según la capacidad antioxidante obtenida mediante NaDES-9 y NaDES-16. Los puntos representan la capacidad antioxidante de las frutas y están coloreados según su pertenencia a uno de los tres clústeres (F1 en azul, F2 en rojo y F3 en verde) distribuidos mediante agrupación jerárquica. Los contornos de color muestran las regiones de influencia de cada clúster en el espacio del porcentaje de capacidad antioxidante obtenido con NaDES 9 y NaDES 16.

Posteriormente, con el objetivo de observar si hay una relación de las frutas agrupadas en relación con su capacidad antioxidante en el contenido de sus propiedades nutricionales se realizó un análisis de varianza entre los clústeres. En

la **Figura 64**, se muestran los parámetros nutricionales que presentaron diferencias significativas. El clúster F2, que se caracteriza por tener frutas con niveles altos de capacidad antioxidante, presenta valores significativamente más altos en cantidad de proteínas, energía, zinc y fósforo, con respecto a los grupos F1 (bajo capacidad antioxidante) y el grupo F3 (medio capacidad antioxidante).

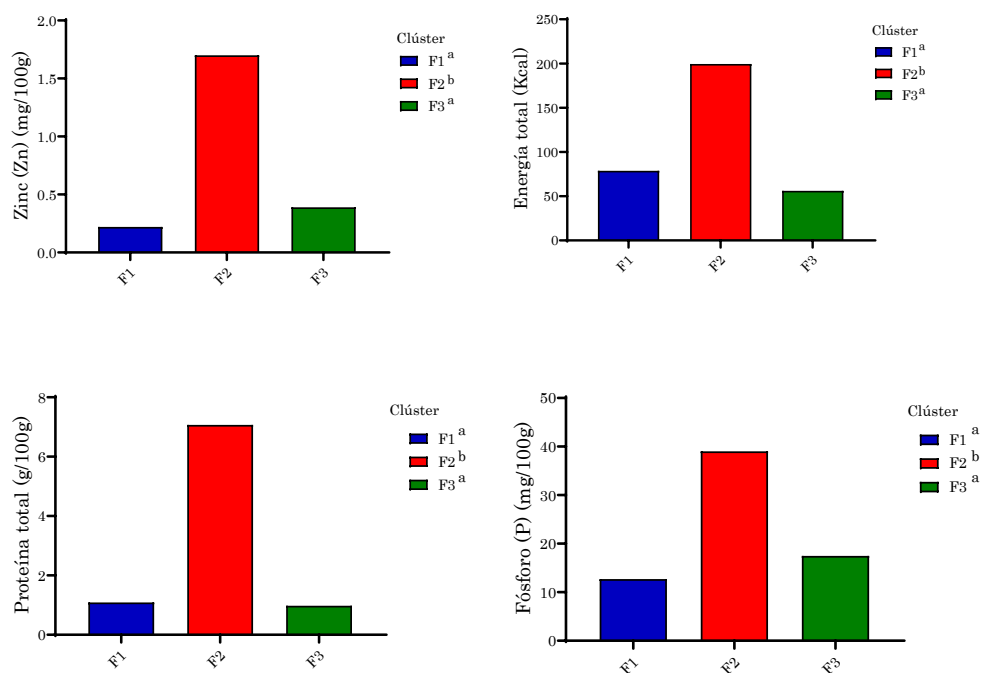


Figura 64 | Contenido nutricional de diferentes frutas agrupadas según su capacidad de inhibición al radical DPPH con los disolventes NaDES. En color azul se representan las frutas con un bajo porcentaje de inhibición del radical DPPH. En color rojo, se muestran las frutas que presentan un alto porcentaje de inhibición del radical DPPH, mientras que en color verde se indican las frutas con un porcentaje medio de inhibición del radical DPPH.

iv. Agrupación (clustering) de frutas mediante porcentaje de inhibición al radical DPPH obtenido con etanol 70%.

Con el propósito de analizar la capacidad de extraer compuestos fenólicos con poder antioxidante del etanol al 70% en las distintas frutas, se realizaron 3 clúster al igual que se obtuvieron con los disolventes NaDES. Esto con el objetivo de comparar ambos tipos de disolventes.

Como resultado se obtuvieron tres grupos etiquetados como: E1 (color azul), E2 (color rojo) y E3 (color verde), como se muestra en la **Figura 65**. Los valores para el grupo E1 fueron de 1% a 10% (color azul), de 27% a 37% para el grupo E2 (color rojo) y de 62% a 82% para el grupo E3 (color verde) pudiéndose considerar como bajo, medio y alta capacidad antioxidante. El análisis de varianza (ANOVA) mostró un valor de F de 129.8 y un valor de $p < 10^{-4}$ (**Figura 66**).

Por otro lado, al observar que los clústeres resultantes de la distribución de las frutas utilizando NaDES y Etanol al 70% eran diferentes, se pudo identificar que algunas frutas incrementan su porcentaje de inhibición del DPPH cuando se emplean los disolventes NaDES en comparación con el Etanol al 70%. Un ejemplo de esto es la fruta acerola, que fue clasificada en el clúster de baja capacidad antioxidante al usar Etanol al 70%, pero que, al utilizar los disolventes NaDES 9 y 16, fue reclasificada en el clúster de capacidad antioxidante media.

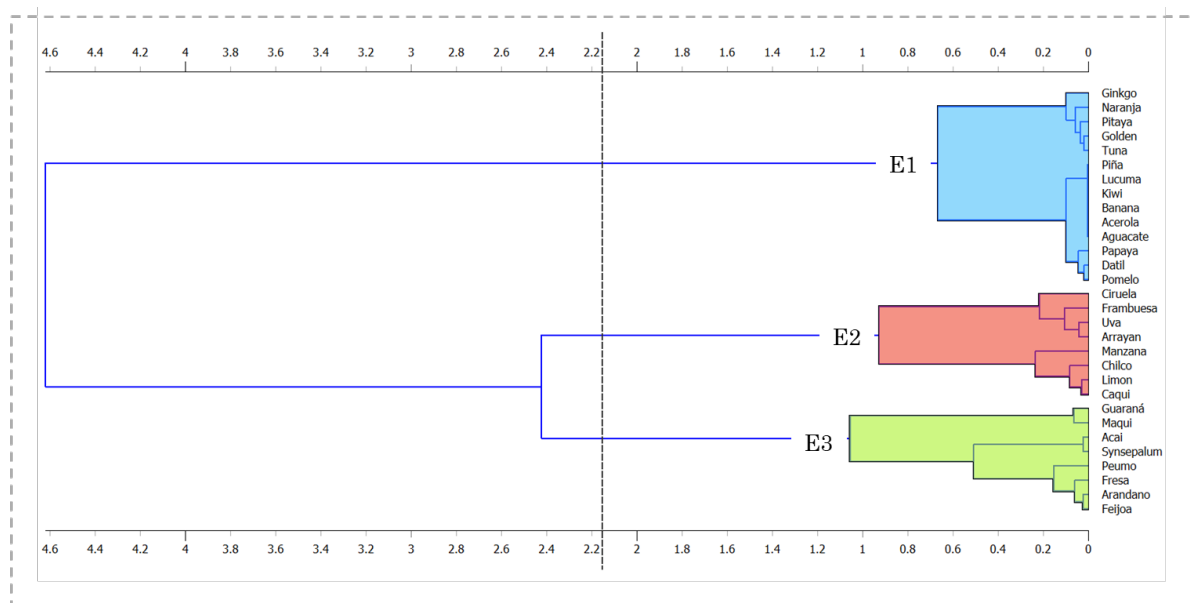


Figura 65 | Agrupación jerárquica de las frutas en función de su % de inhibición al radical DPPH obtenida con el disolvente Etanol al 70%. clústeres generados con el algoritmo de agrupación jerárquica mediante el software orange3. Los clústeres se representan con la etiqueta “E”, donde se observa la distribución a través de 3 clústeres de las frutas según la capacidad antioxidante (porcentaje de inhibición de DPPH) obtenido mediante etanol al 70%.

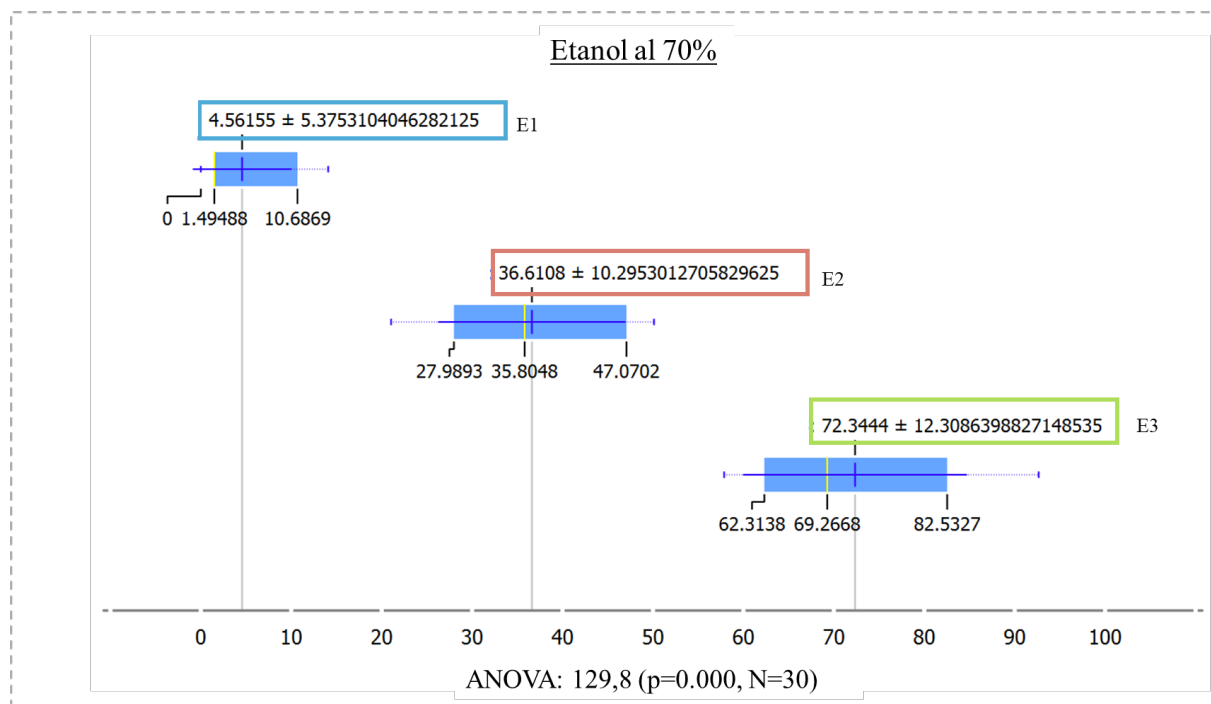


Figura 66 | Distribución de las frutas según su % de inhibición al radical DPPH obtenida mediante Etanol al 70%. Diagrama de dispersión de la capacidad antioxidante representada como porcentaje de inhibición al radical DPPH mediante el Etanol al 70%. Los valores medios y la dispersión de la capacidad antioxidantes se presentan para los tres Clústeres (E1, E2 y E3), mostrando diferencias significativas entre ellos (ANOVA: 131, P menor de 10^{-4}). Las cajas representan el rango intercuartil (IQR) de los datos, las líneas dentro de las cajas indican la mediana, y los bigotes se extienden hasta los valores mínimos y máximos que no son considerados valores atípicos

Al observar la diferencia en los clústeres, se decidió evaluar la capacidad antioxidante de cada fruta utilizando todos los disolventes NaDES y compararlos con el Etanol al 70%. Para llevar a cabo esta comparación, primero fue necesario establecer un rango de valores que clasificara a las frutas en baja, media o alta capacidad antioxidante. Los rangos se determinaron utilizando los valores del clúster generado mediante NaDES 9, ya que presentaban un valor de ANOVA mayor que los obtenidos con NaDES 16 y Etanol al 70%.

Sin embargo, estos rangos no cubrieron todos los valores posibles (0% a 100% de inhibición), lo que generó “brechas” numéricas. Si una fruta tiene un valor dentro

de estas “brechas”, no se puede clasificar adecuadamente. Motivo por el que se promedió los rangos de los clústeres obtenidos con Etanol al 70% y con los disolventes NaDES 9 y NaDES 16, que ha permitido los siguientes rangos de clasificación: 1% a 20% como baja capacidad antioxidante, 21% a 55% como media capacidad antioxidante, y 56% a 100% como alta capacidad antioxidante.

Obteniendo el rango establecido para clasificar las frutas, se realizó el estudio comparativo. La clasificación de las frutas se llevó a cabo seleccionando el valor máximo del % de inhibición al radical DPPH obtenido con distintas NaDES y se comparó con el valor correspondiente obtenido con etanol al 70%, los resultados se muestran en la **Tabla 16**. Se encontraron diferencias en la eficacia de estos disolventes. Frutas como el açaí, guaraná y maqui mostraron altos poderes antioxidantes tanto con etanol como con NaDES, alcanzando valores entre 74% y 93%. En contraste, limón, la acerola y el aguacate (señalado con un recuadro rojo), que no presentaron capacidad antioxidante con etanol, mostrando valores medio y altos con NaDES, sugiriendo que estos disolventes son más efectivos para ciertas frutas. El arándano y la frambuesa también destacaron con valores altos de capacidad antioxidante usando NaDES. Frutas como la banana y el kiwi demostraron bajos poderes antioxidantes independientemente del solvente. Algunas frutas como la ciruela y la manzana mejoraron de un nivel medio con etanol a alto con NaDES. En el caso de *S. dulcificum*, el disolvente etanol ha obtenido mayor capacidad antioxidante.

Al evaluar de manera general la capacidad antioxidante que obtienen los NaDES mediante un mapa de calor (heat map) (**Figura 67**) se observa que, en la mayoría de los casos, los disolventes NaDES son más efectivos que el etanol al 70% para extraer la capacidad antioxidante de diversas frutas. En particular NaDES 24 y NaDES 27, logran extraer altos niveles de capacidad antioxidante de frutas como la acerola, el arándano, la frambuesa, la fresa y la manzana, superando los resultados obtenidos con etanol al 70%. En frutas como el limón y el aguacate, los NaDES muestran una capacidad antioxidante mayor comparada con el etanol al 70%. Aunque el etanol al 70% es efectivo en ciertos casos específicos, como en el maqui y guaraná, los NaDES demuestran ser más versátiles y eficaces en la

mayoría de las frutas estudiadas. Frutas que no presentaban actividad antioxidante con etanol, como la acerola y el aguacate, mostraron altos valores de capacidad antioxidante cuando se usaron disolventes NaDES.

Tabla 16 | Porcentaje de inhibición al radical DPPH de diversas frutas utilizando etanol al 70% y NaDES como disolventes.

Fruta	% de inhibición al radical DPPH de compuestos obtenidos con etanol 70%	% de inhibición al radical DPPH de compuestos obtenidos con NaDES (selección del valor máximo entre los NaDES)	Clasificación de las frutas		Disolvente que presenta una mayor capacidad para extraer compuestos con capacidad antioxidante.
			*Nivel de capacidad antioxidante según valor obtenido con etanol al 70%	*Nivel de capacidad antioxidante según valor obtenido con NaDES	
Acai	74,20	37,84	alto	medio	Etanol al 70%
Acerola	0,00	87,07	-	alto	NaDES 30
Aguacate	0,00	35,93	-	medio	NaDES 24
Arandano	61,90	85,84	alto	alto	NaDES 27
Banana	0,00	9,67	-	bajo	NaDES 7
Ciruela	40,79	73,76	medio	alto	NaDES 24
Dátil	1,80	23,50	bajo	medio	NaDES 1
Frambues	45,63	84,81	medio	alto	NaDES 24
Fresa	64,34	75,72	alto	alto	NaDES 21
Guaraná	90,07	90,07	alto	alto	Etanol al 70%/NaDES 9
Kiwi	0,00	11,46	-	bajo	NaDES 13
Limón	28,52	87,43	medio	alto	NaDES 24
Lúcuma	0,00	28,38	-	medio	NaDES 12
Manzana	21,04	66,60	medio	alto	NaDES 24
Maqui	92,65	90,10	alto	alto	Etanol 70
Naranja	9,55	28,47	bajo	medio	NaDES 4
Papaya	2,96	13,46	bajo	medio	NaDES 16
Piña	0,00	20,30	-	medio	NaDES 27
Pitaya	12,20	15,06	bajo	bajo	NaDES 13
Pomelo	1,19	14,86	bajo	bajo	NaDES 28
DMB @	75,00	72,32	alto	alto	Etanol 70
Uva	48,51	60,95	medio	alto	NaDES 24
Arrayan	50,11	44,46	medio	medio	Etanol 70
Caqui	27,45	46,38	medio	medio	NaDES 15
Chilco	30,82	47,62	medio	medio	NaDES 6
Feijoa	62,73	76,30	alto	alto	NaDES 24
Golden	10,69	11,48	bajo	bajo	NaDES 4
Ginkgo	14,09	23,01	bajo	medio	NaDES 23
Peumo	57,88	76,18	alto	alto	NaDES 24
Tuna	11,39	19,82	bajo	bajo	NaDES 22

* Porcentaje de inhibición al radical DPPH: 1% a 20% baja, 21% a 55 media y 56% a 100% alta.

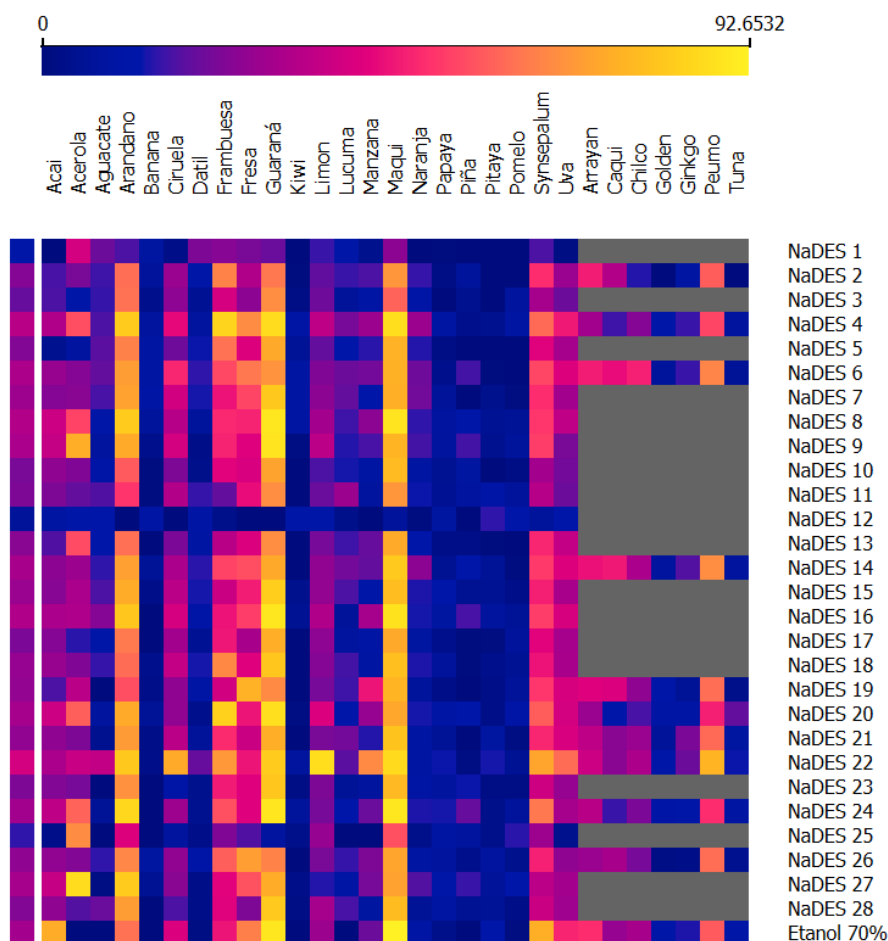


Figura 67 | Matriz de calor que muestra el porcentaje de inhibición al radical DPPH diversas frutas utilizando diferentes disolventes NaDES y etanol al 70. Los colores varían desde azul oscuro, que indica un bajo porcentaje de inhibición del radical DPPH (1%), hasta amarillo brillante, que indica un alto porcentaje de inhibición del radical DPPH (92%). Las áreas en gris representan experimentos que no se realizaron. La barra de colores que esta al superior del gráfico representa la escala de valores.

v. **Agrupación (clustering) de los disolventes NaDES con respecto al porcentaje de inhibición al DPPH que obtienen de frutas.**

Hasta ahora, se ha analizado la distribución de las frutas en función de sus propiedades nutricionales y su capacidad antioxidante. Con el fin de profundizar en este análisis, se buscó identificar qué tipo de frutas están más estrechamente relacionadas con la distribución observada al utilizar los disolventes NaDES.

A partir del tercer clúster cada uno de ellos comienza a estar constituido por una única fruta. Esta situación dificulta la justificación de una comparación significativa entre los clústeres, ya que, al estar formados por un solo elemento, no cumplen con el objetivo de agrupar con características similares. Por lo tanto, la interpretación de estos resultados pierde relevancia en términos de análisis comparativo entre grupos.

En la **Figura 68**, se puede observar que el grupo N1 (color azul) está compuesto por tres NaDES: 1, 13 y 28. El grupo N3 (color verde) incluye los NaDES: 8, 9, 22, 4, 20, 16, 27, 24 y 27. El grupo N2 (color azul) está constituido por los NaDES restantes, siendo el grupo con el mayor número de disolventes generados, resultados obtenido mediante la distribución jerárquica.

Las frutas arándano y guaraná mostraron tener más relevancia en la distribución de los tres clústeres, mostrando una varianza (ANOVA) entre los grupos de 63 y 13, respectivamente, ambos con un $P < 10^{-4}$, resultados obtenidos mediante el diagrama de caja y bigotes (**Figura 69**). Estos valores indican y muestran una diferencia significativa entre los mismo NaDES para extraer compuestos fenólicos. El clúster N1 (color azul) posee valores entre 1% a 50% de capacidad antioxidante, el clúster N2 (color rojo) mostró una inhibición del 60% al 80%, y el clúster N3 tuvo valores del 84% a 90%.

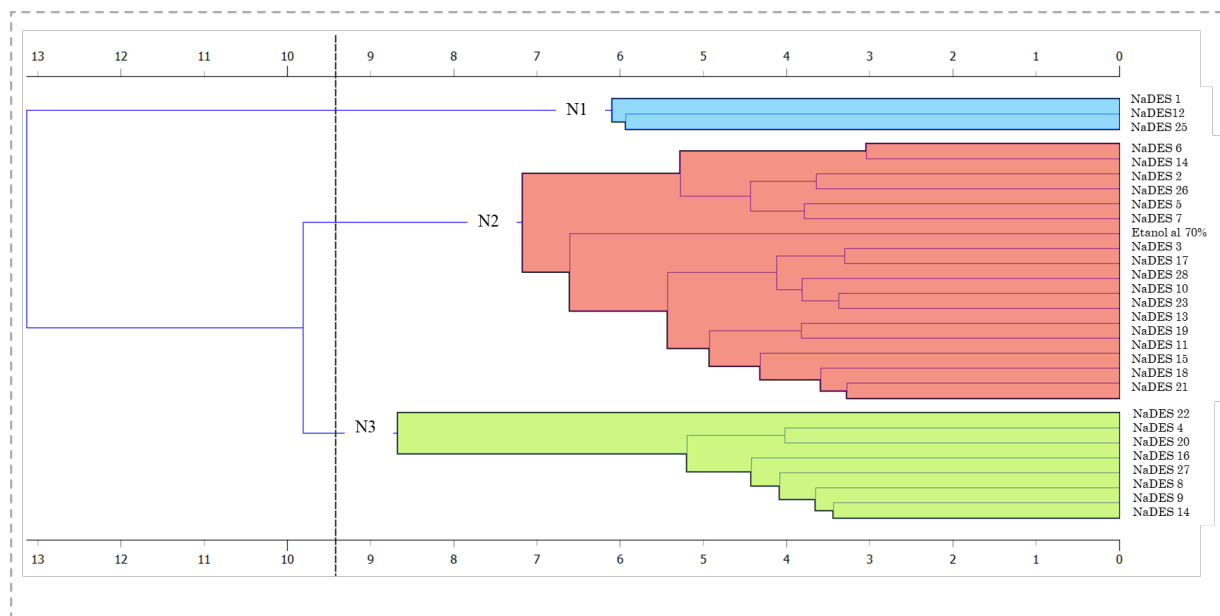


Figura 68 | Agrupación jerárquica de los NaDES y etanol al 70% con respecto al % de inhibición al radical DPPH de las frutas arándano y guaraná. n esta figura se observa la formación de clústeres generados en función del porcentaje de inhibición del radical DPPH por los polifenoles extraídos utilizando diferentes disolventes. Los disolventes NaDES y el Etanol al 70% se agruparon en tres clústeres principales (N1, N2 y N3).

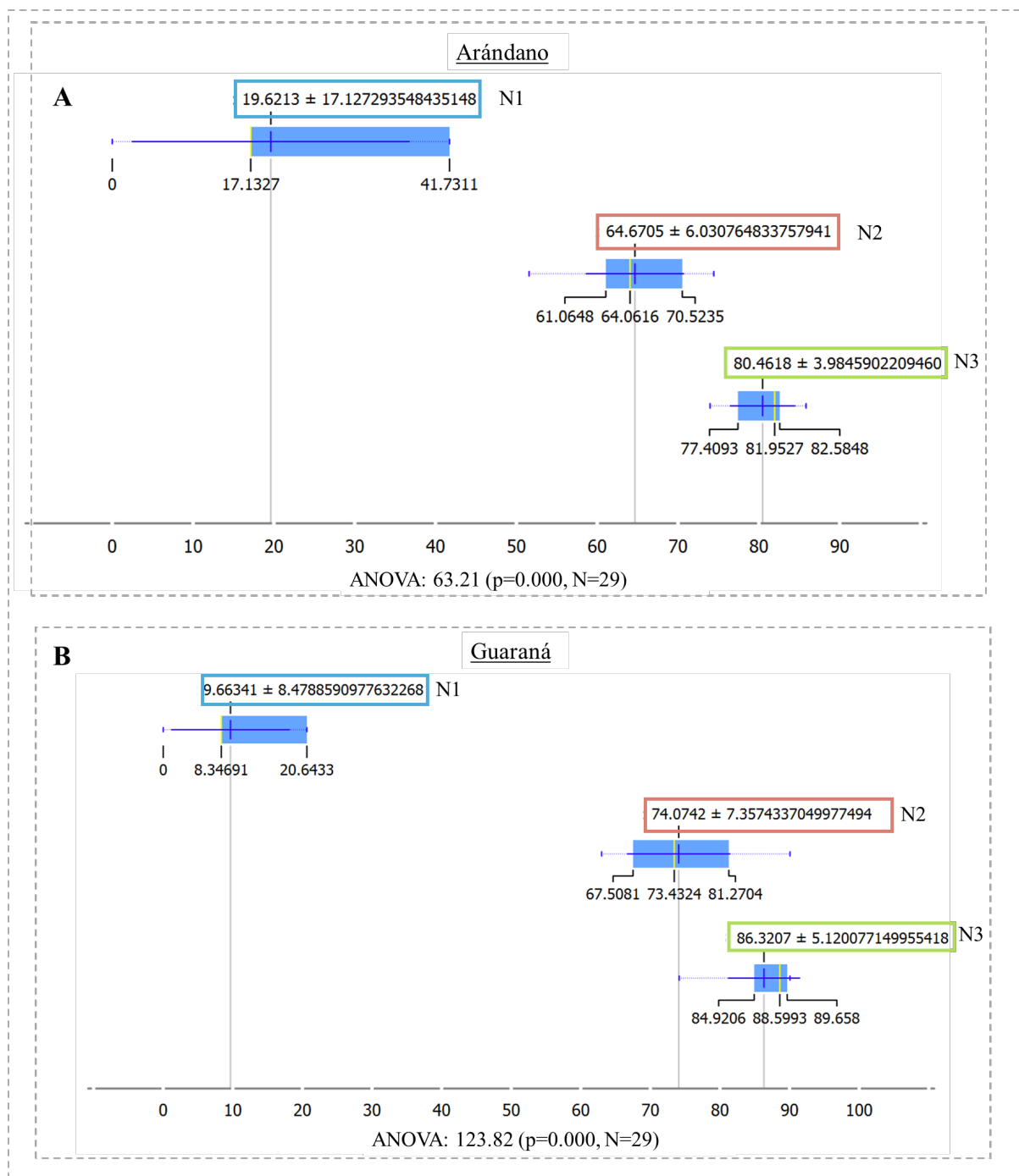


Figura 69 | Distribución de las NaDES con respecto al % de inhibición al radical DPPH de las frutas arándano y guaraná. El diagrama de dispersión muestra la capacidad antioxidante de arándano (A) y guaraná (B), agrupada en tres clústeres (N1, N2 y N3). En ambos casos, hay diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, $P < 10^{-4}$). Las cajas indican el rango intercuartil y los bigotes muestran los valores extremos no atípicos.

6. Discusión

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el potencial del producto DMB® de la empresa Medicinal Gardens S.L., así como los subproductos generados durante su procesamiento, específicamente hojas y semillas de la planta *S. dulcificum*. Se busca explorar su posible aplicación en las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria. También se investigó la obtención de la proteína miraculina, reconocida por su alto valor comercial. Este trabajo se desarrolló bajo la vanguardia de la investigación aplicada, promoviendo una economía circular al aprovechar subproductos.

Por otro lado, ante la necesidad de alternativas seguras, naturales, innovadoras y sostenibles para la extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, se evaluaron los Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES). Estos disolventes son conocidos como una opción prometedora en términos de rendimiento de extracción en comparación con los métodos tradicionales (Bakirtzi et al., 2016). Los NaDES, al ser compuestos biodegradables y biocompostables, pueden contribuir a la reducción de la huella de carbono y mejorar la seguridad y el manejo de residuos. Para analizar la relación entre los NaDES y los compuestos fenólicos obtenidos a partir de diversas frutas, se emplearon técnicas de aprendizaje automático (Machine Learning). Estas técnicas permitieron identificar los factores asociados con las propiedades nutricionales y la capacidad antioxidante de dichos compuestos fenólicos.

6.1. Obtención y cuantificación de compuestos fenólicos de *Synsepalum dulcificum* mediante disolvente convenciones.

Se extrajeron y analizaron compuestos fenólicos de semillas, hojas y pulpa (DMB®) de *S. dulcificum*. En el caso de la pulpa (DMB®), se utilizaron agua y etanol como disolventes debido a que los compuestos fenólicos en esta matriz, menos lignificada y con menor contenido de polisacáridos, son más accesibles a disolventes polares (Hensen et al., 2022). En contraste, las semillas y hojas poseen

paredes celulares más complejas, con mayor contenido de lignina y celulosa, lo que dificulta la liberación de los compuestos fenólicos. Para estas matrices, se utilizó metanol, un disolvente que facilita la ruptura de estas estructuras y permite una extracción más eficiente de los compuestos fenólicos (Do et al., 2014).

6.1.1. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de DMB®.

Se obtuvieron compuestos fenólicos utilizando un gradiente de etanol. Sin embargo, se observó una gran variabilidad según el porcentaje de etanol utilizado, con valores entre 5 y 14 mg GAE/g PS y una capacidad antioxidante de los compuestos entre 40 y 80 $\mu\text{mol trolox/g PS}$ (**Figura 20**). Estudios previos señalan que factores como la cantidad de muestra, el tiempo y la temperatura de extracción pueden influir en el rendimiento de estos compuestos (Sun et al., 2015). Por ello, se realizó una estandarización con distintos porcentajes de etanol, ratios muestra/solvente y tiempos de extracción para determinar que parámetros permiten compuestos con mayor capacidad antioxidante.

La estandarización en la obtención de compuestos fenólicos de DMB® mostró que los valores máximos de fenoles totales se obtuvieron con etanol 70%, independiente del ratio muestra/solvente y el tiempo de extracción, consiguiendo aproximadamente 14 mg GAE/g PS (**Figura 21**). Estos valores son similares a estudios previos que reportan entre 13.7 y 16.43 mg GAE/g PS (Wagner et al., 2023). El etanol rompe las membranas celulares, permitiendo la liberación de compuestos bioactivos internos de la célula vegetal (Monroy et al., 2016; Jiménez-Moreno et al., 2019; Iza et al., 2023). Además, el agua ayuda a la solubilidad al disminuir la distancia entre grupos hidroxilo y aumentar la distancia entre grupos metilo (Wang et al., 2019a).

Al cuantificar la capacidad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH, los fenoles obtenidos con los parámetros etanol al 70%, una proporción de 1:10 p/v y una hora de extracción, extrajeron compuestos con mayor capacidad antioxidante, alcanzando 100 $\mu\text{mol trolox/g PS}$ (**Figura 24**). Estos valores superan hasta cinco veces la actividad obtenida en trabajos previos, como el de Wagner et al., 2023. Las variaciones podrían ser por las diferencias en las técnicas de

extracción, específicamente el uso de fluidos supercríticos en lugar de agitación magnética, así como por factores relacionados con el mantenimiento, la manipulación y el proceso de extracción.

Los extractos de DMB® muestran una inhibición al radical DPPH similar o superior al de frutas valoradas por su alta capacidad antioxidante, como la ciruela roja (*Prunus domestica*) con 57 ± 3 $\mu\text{mol trolox/g PS}$ y el arándano (*Vaccinium corymbosum*) con 188 ± 5 $\mu\text{mol trolox/g PS}$. Esta comparación demuestra que DMB® puede ser un potencial “superalimento” en la industria alimentaria y nutricional, con efectos beneficiosos asociados al estrés oxidativo y la prevención de enfermedades crónicas.

6.1.2. Capacidad antioxidante de semilla de *Synsepalum dulcificum*

Se ha demostrado que en semilla el disolvente que logra captar compuestos con mayor porcentaje de inhibición al radical DPPH fue el etanol al 70%, alcanzando 18 ± 8 $\mu\text{mol trolox/g PS}$, seguido por etanol al 40% con $10,3 \pm 0,5$ $\mu\text{mol trolox/g PS}$ (Figura 35).

La mayor eficacia del etanol al 70% se debe a su polaridad. La polaridad de los disolventes permite la extracción eficiente de una amplia gama de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales son esenciales para la actividad antioxidante. Este comportamiento también se ha visto en otros trabajos donde a partir de linaza, semilla de consumo habitual, la proporción de etanol y agua más adecuada se consigue a 60:40 (v/v), lo que permite obtener una mayor cantidad de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante (Waszkowiak and Gliszczyńska-Świgło, 2016).

6.1.3. Capacidad antioxidante de hoja de *Synsepalum dulcificum*

Los extractos de hoja mostraron una inhibición al radical DPPH significativa con los disolventes etanol al 40% y 70%, obteniendo 443 ± 23 $\mu\text{mol trolox/g PS}$ y 373 ± 53 $\mu\text{mol trolox/g PS}$, respectivamente en comparación con el metanol y agua (Figura 42). Futuras investigaciones podrían centrarse en optimizar las condiciones de extracción incluyendo temperatura, tiempo y pH, o implementar el uso de técnicas avanzadas como el ultrasonido o la microondas para mejorar más el rendimiento.

Se compararon extractos de la hoja de *S. dulcificum* con diferentes tés e infusiones comerciales (**Figura 43**), como té rooibos, menta, manzanilla y yerba mate, obteniendo calores similares. El rooibos es rico en flavonoides con fuertes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y cardioprotectoras (Windvogel, 2020). La menta contiene antioxidantes como flavonoides y ácidos fenólicos que ayudan en la digestión y alivian el estrés (Brown et al., 2019). La manzanilla es rica en apigenina, un flavonoide mejora la digestión y calma los nervios. La yerba mate contiene xantinas y otros compuestos antioxidantes que aumentan la energía, mejoran la concentración y apoyan el metabolismo. Estos resultados sugieren que la hoja de *S. dulcificum* tiene potencial para usos beneficiosos en la salud humana. Estudios previos han demostrado su capacidad para el desarrollo de fármacos y productos funcionales (Obafemi et al., 2017; Liu et al., 2021). El presente estudio, discutido más adelante, también respalda estos descubrimientos (Obafemi et al., 2017; Liu et al., 2021).

Además, en el ámbito industrial alimenticio, la hoja de *S. dulcificum* podría competir eficazmente en el mercado de bebidas saludables, ofreciendo las mismas características antioxidantes que las infusiones comerciales.

6.2. Identificación de compuestos fenólicos de *Synsepalum dulcificum*

Se utilizaron técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para identificar los compuestos fenólicos de DMB®, y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para identificar los compuestos *volátiles y semivolátiles* de extractos acuosos de semillas, hojas y pulpa (DMB®) de *S. dulcificum*.

Mediante la técnica espectrometría de gases acoplada a masas (GC-MS), se identificó compuestos de diferentes familias químicas en *S. dulcificum*, como alcoholes, lípidos y ácidos orgánicos. Cada pico detectado, mostrado en la **Tabla 9**, señala tres compuestos que coinciden en masa y estructura molecular, por ende, en tiempo de retención, por lo que es necesario un análisis complementario para

determinar el compuesto específico presente en la muestra. La validación de estos compuestos es de importancia para avanzar en su aplicación práctica. Técnicas como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) podrían ser de ayuda para este propósito.

6.2.1. Identificación de compuestos en DMB®

Los compuestos fenólicos identificados en DMB® mediante HPLC con etanol al 0%, 30%, 70% y 100% fueron: ácido gálico (AG), ácido protocatecúico (AP), catequina (CAT), ácido cafeico (ACaf), ácido siríngico (ASyr), rutina (RUT), vanilina (VAN), ácido cumárico (AC), ácido ferúlico (AF), ácido salicílico (AS), quercetina (QE) y ácido cinámico (ACin) (**Tabla 8**). Estos resultados coinciden con la literatura existente, donde algunos de estos compuestos se habían identificado a partir de extractos metanólicos (Chen et al., 2010; Obafemi et al., 2019; Chen, Qi, Tingting Liu, Tuya Bai, Mengdi Zhang, Yuxia Hu, 2022; Ma et al., 2022). Sin embargo, por primera vez se describe el compuesto el ácido protocatecúico la baya de *S. dulcificum*. Este compuesto posee propiedades quimiopreventivas, antiinflamatorias y regula el metabolismo celular (Lin et al., 2007; Kakkar and Bais, 2014; Zhang et al., 2021; Cadena-Iñiguez et al., 2024).

En la **Tabla 17** , se muestran la posible aplicabilidad de cada compuesto identificado, lo cual aporta mayor valor a DMB® y su comercialización como suplemento alimentario

Tabla 17 | Compuestos identificados en DMB® mediante HPLC y sus propiedades.

Tipo de polifenol	Compuestos	Propiedad	Referencia
Ácido fenólico	Ácido gálico; Ácido protocatecúico	Mitiga el estrés oxidativo y promueve la salud cardiovascular y potencial anticancerígeno	(Bai et al., 2021; Jiang et al., 2022; Cadena-Iñiguez et al., 2024)
Flavonoide	Catequina	Mitiga el estrés oxidativo; Promueve la salud cardiovascular; la mejora de la función endotelial; protección contra enfermedades crónicas	(Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018; Musial et al., 2020; Dutra et al., 2024)
Ácido fenólico/Flavonoide	Ácido caféico; ácido siríngico; rutina	Propiedades antiinflamatorias y neuro-protectoras. Prevención de trastornos inflamatorios, neurodegenerativos, antidiabético y cardiovascular.	(Ghorbani, 2017; Liu et al., 2020; Silva and Lopes, 2020; Yong et al., 2020; Bartel et al., 2023)
Ácido fenólico	Vanilina*; Ácido cumárico	Actividad antimicrobiana. Antioxidantes. Antiinflamatorio. Aplicaciones farmacéuticas como agente antimicrobiano y cicatrizante natural	(Pei et al., 2016; Ghasemi-Dehnoo et al., 2022; Xiong et al., 2022; Sinsuebpol et al., 2023)
Ácido fenólico	ácido ferúlico; Ácido salicílico*	Antioxidante. Protección contra la radiación UV, neuroprotector y propiedades antienvjecimiento	(Peres et al., 2018; Zduńska et al., 2018; Ausina et al., 2020; Li et al., 2021)
Flavonoide/Ácido fenólico	Quercetina; Ácido cinámico	Propiedad antiinflamatoria y antidiabéticas	(Vessal et al., 2003; Chukwuma et al., 2021; Qi et al., 2022)

*Estructuralmente no se clasifica dentro de los principales grupos de polifenoles.

Con la técnica de espectrometría de gases acoplada a masas (GC-MS), se identificaron 15 compuestos (**Tabla 9**) con tiempos de retención entre 5.14 y 24.26 minutos, de los cuales cuatro han sido reportados en trabajos previos. Estos compuestos son: p-Dioxano-2,3-diol (RT 5.14) y Melezitosa (RT 15.67 min.), que destacan por su papel crioprotector, potenciador de sabor y como tensioactivo potencial (Behera and Balaji, 2021) ; el ácido l-(+)-ascórbico 2,6-dihexadecanoato (RT 20.11 min.), que es un posible antiinflamatorio (Plaza-Oliver et al., 2020) ; y el 1-palmitato de glicerol (RT 24.26 min.), que es un compuesto anticancerígeno (Chen, Qi, Tingting Liu, Tuya Bai, Mengdi Zhang, Yuxia Hu, 2022; Niu et al., 2023).

También se identificaron los compuestos glicerina y ácido hexadecanoico. Esos compuestos se utilizan en las industrias cosmética y farmacéutica por sus cualidades antiinflamatorias, antioxidantes, hidratantes y emolientes (Aparna et al., 2012; Becker et al., 2019). Los compuestos 2,5-dimetilfuran-3,4(2H,5H)-diona y eritritol poseen propiedades antioxidantes, lo que los hace de interés para la industria alimentaria, en su producción y conservación (Moon et al., 2010; Zou et al., 2013; Johra et al., 2023). Además, 3-amino-2-oxazolidinona y ácido propanoico tienen potencial farmacéutico debido a sus características antimicrobianas (Duscha et al., 2020; Jiang et al., 2020).

6.2.2. Identificación de compuestos de semilla de *Synsepalum dulcificum*.

Se identificaron 12 posibles compuestos, de los cuales dos ya se habían descrito en estudios previos. El compuesto 1-palmitato de glicerol (RT 24.26 min.) como se mencionó anteriormente, posee propiedades anticancerígenas (Chen, Qi, Tingting Liu, Tuya Bai, Mengdi Zhang, Yuxia Hu, 2022; Niu et al., 2023). El ácido octadecanoico, éster 2,3-dihidroxipropílico (RT 26.23 min.), posee un amplio espectro antibacterial y se estudia para su posible uso en la administración de fármacos (Mengesha et al., 2013; Rai et al., 2021).

Además, compuestos han sido descritos previamente en la pulpa que en nuestro estudio los hemos identificado también en semilla (Xie et al., 2024). Esto sugiere

que ciertos metabolitos son comunes en diferentes partes de la planta, variando su concentración, como ocurre en otras especies (Lv & Guo, 2023). Entre estos compuestos se encuentra la 2-hidroxi-N,3,3-trimetilbutanamida (RT 5.53 min.), que posee propiedades antimicrobianas que podrían contribuir a la defensa de la planta contra patógenos (Chatterjee et al., 2020). También se identificaron el eritritol (RT 10.38 min.), la melezitosa (RT 15.39 y 17.31 min.) y el ácido n-hexadecanoico (RT 20.11 min.), con propiedades ya mencionadas anteriormente.

Entre los otros compuestos identificados en el análisis se encuentra la paromomicin, conocida por su potencial antibiótico (Davidson et al., 2009; Ibrahim et al., 2019), y la Desulfosinigrina, un posible agente anticancerígeno (Weil et al., 2004). En el ámbito de la nutrición, el ácido cis-vaccénico emerge como un componente activo en la reducción de la lipogénesis (Burns et al., 2012).

La presencia de estos compuestos en la semilla demuestra su gran potencial para la actualidad, no solo en el ámbito de la salud, con aplicaciones anticancerígenas y antibacterianas, sino también en la administración de fármacos y la nutrición. El descubrimiento de compuestos como el 1-palmitato de glicerol y el ácido octadecanoico, éster 2,3-dihidroxi-propílico, demuestra la importancia de *S. dulcificum* en el ámbito terapéutico.

6.2.3. Identificación de compuestos de hoja de *Synsepalum dulcificum*.

El análisis del extracto de hoja mostró la presencia de cinco compuestos (Tabla 12), de los cuales, el ácido quínico y el ácido n-hexadecanoico ya han sido reportados previamente, ambos con propiedades significativas para la salud humana.

El ácido quínico, identificado en el RT 17.27 min., es un antioxidante natural y presenta versatilidad en la síntesis de nuevos productos farmacéuticos (Choi et al., 2021; Feng et al., 2022). El ácido n-hexadecanoico, encontrado en el RT 20.11 min., está asociado con la lipogénesis de la planta y se utiliza en procesos de maduración de alimentos poco procesados, como las aceitunas. Otro de los compuestos obtenidos en el análisis fue el 4H-Pyran-4-one en el RT 11.86 min, conocido por su actividad anticancerígena. Este compuestos puede afectar rutas metabólicas clave como la quinasa mTOR, implicada en la supervivencia y proliferación de células

tumorales, y bloquear vías de reparación del ADN en estas células (Tsuji et al., 2017; Peroković et al., 2020).

La identificación de estos compuestos demuestra el potencial de las hojas de esta planta para aplicaciones en la salud humana y el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

6.3. Actividad biológica de *Synsepalum dulcificum*.

6.3.1. Seguridad alimentaria.

En el presente estudio se evaluaron los efectos hemaglutinantes y hemolíticos de un extracto de *S. dulcificum* DMB®, hoja y semilla sobre eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O. El objetivo principal fue corroborar la seguridad alimentaria de estos extractos.

El extracto de DMB® no mostró ninguna actividad hemaglutinante y hemolítica en las condiciones evaluadas. La ausencia de hemaglutinación en todas las diluciones demuestra que los extractos no poseen componentes que interactúen de manera adversa con los eritrocitos. Este resultado es indicativo de la seguridad del extracto en términos de no inducir respuestas inmunológicas que podrían ser perjudiciales para los consumidores.

Por otro lado, la hemólisis observada en concentraciones altas de los extractos de semilla y hoja que han generado en los grupos sanguíneos A, B y O (diluciones bajas) indica que ciertos compuestos presentes en el extracto, como los esteroides (β -sitosterol y lupeol), flavonoides y fenoles, pueden desestabilizar las membranas celulares de los eritrocitos. Estos compuestos pueden alterar la permeabilidad de las membranas celulares al interactuar con los lípidos de la bicapa lipídica, lo que resulta en una ruptura de la membrana y la liberación de hemoglobina. Dicho efecto ha sido observado en modelos experimentales con membranas celulares y en el contexto de su actividad antioxidante y farmacológica, donde los flavonoides también influyen en la permeabilidad y la dinámica de las membranas (Chen et al., 2010; Saha et al., 2020)

No obstante, la actividad hemolítica también ha sido observada en diversas plantas medicinales actualmente utilizadas para el consumo humano, como *Origanum grosii* y *Thymus pallidus* (Zejli et al., 2024). En estos casos, se han estandarizado las concentraciones adecuadas para su uso como productos alimenticios, asegurando que no se pierdan los efectos deseados. En contraste, aunque tanto la semilla como la hoja de *S. dulcificum* no son aptas para el consumo humano directo en altas concentraciones, pueden ser utilizadas en aplicaciones farmacológicas, dado que este estudio ha demostrado sus efectos beneficiosos para la salud.

6.3.2. Dosis- respuesta frente a líneas de cáncer colorrectal.

En esta fase experimental el objetivo fue investigar la posible potencialidad de la planta para ser utilizada en un ámbito biomédico. Para ello, se han realizado diferentes ensayos de viabilidad celular con extractos de DMB®, semilla y hoja frente al cáncer colorrectal. Para ello, se utilizó el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI50), que mide la concentración necesaria de un compuesto de un compuesto para inhibir la actividad biológica en un 50% (Yung-Chi and Prusoff, 1973).

En este sentido, tras la exposición del extracto acuoso de DMB® (disolvente seleccionado por ser más seguro que el disolvente etanol y presenta menor residuos tóxicos tras su purificación) a cuatro líneas celulares de cáncer colorrectal (DLD-1, HT-29, SW640 y SW480), se demostró la capacidad del extracto para reducir la viabilidad celular de manera dosis-dependiente. Los valores de CI50 fueron de $12,3 \pm 0,4$ mg/mL para la línea celular DLD-1, $12,5 \pm 0,4$ mg/mL para HT-29, $12,9 \pm 0,4$ mg/mL para SW480, y $11 \pm 0,4$ mg/mL para SW620. Estos resultados indican una inhibición de la proliferación celular al incrementar las concentraciones del extracto de DMB® (**Figura 29**). Estudios previos evaluaron el extracto DMB® en la línea celular DLD-1, sin embargo, no fueron capaces de identificar el valor CI50 ya que las concentraciones evaluadas fueron muy bajas. No obstante, para la línea celular HT-29, se lograron determinar el CI50, con un valor de 0,046 mg/mL. Es decir, un 26% menos de extracto que en nuestro estudio. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la sensibilización celular diferencial, dependiendo de la

susceptibilidad de cada línea celulares al extracto y del propio extracto. El modo de preparación y conservación del extracto también influye en las moléculas efectoras de la actividad y debe ser tenido en cuenta (protocolizado) para la optimización de futuras aplicaciones biomédicas del mismo (Jichang Seong, Glenn G Oyong, 2018; Wagner et al., 2023).

DMB® al tener efecto sobre las líneas celulares, se puede inferir que interfiere en procesos celulares esenciales para la proliferación de células tumorales, lo que puede ser relevante para el desarrollo de terapias alternativas o complementarias en el tratamiento de cánceres específicos.

Con el objetivo de potenciar los efectos que la quimioterapia sobre las líneas de cáncer, se combinó extractos de DMB® con oxaliplatino, la principal quimioterapia utilizada en los pacientes para tratar el cáncer colorrectal (**Tabla 10**). En las líneas celulares DLD-1 y SW620, se observaron una mejora en la eficacia terapéutica al comparar los CI50 de las células tratadas con las células control (**Figura 30A y B**). Se redujo significativamente los valores de CI50 del fármaco, lo que sugiere un posible efecto sinérgico al combinar el extracto y el agente quimioterapéutico. Sin embargo, la acción de DMB® y oxaliplatino se tiene que estudiar con mayor profundidad para evaluar el modo de acción.

La acción de DMB®, se puede atribuir a mecanismos moleculares que favorecen la sensibilización de las células tumorales ante el tratamiento. Lo esperado es establecer combinaciones capaces de mejorar la supervivencia libre de progresión y la respuesta que se tenga al tratamiento actual, como se observa al combinar oxaliplatino y fluoracilo (Douillard et al., 2000). No obstante, al realizar un análisis molecular preliminar de los biomarcadores proteicos que tienen relación en la supervivencia y progresión tumoral, no se identificaron diferencias significativas en las células tratadas con respecto al control. Esto sugiere que el tratamiento no participa en las vías de señalización estudiadas, como la ruta PI3K/AKT que es retroalimentada por la expresión del canal ABCG2 (BCRP1) (Wang et al., 2019b) o la ruta de señalización NOTCH1 reconocida por la tumorigénesis, asociada a la expresión de DCLK1 (Broner et al., 2021).

Sin embargo, las células poseen mecanismos de compensación que podrían mantener estables los niveles de estos marcadores proteicos, incluso cuando algunas vías de señalización son alteradas (Trusolino and Bertotti, 2012; Brolosy and Stainier, 2017). La disminución de la viabilidad celular no necesariamente se traduce en alteraciones en los biomarcadores, ya que el mecanismo de acción del tratamiento podría estar actuando en rutas moleculares distintas a las evaluadas en este trabajo.

Por otro lado, en las líneas celulares HT-29 y SW480 al tratarlas con DMB® y oxaliplatino, no mostraron diferencias significativas con respecto al control (**Figura 30 B y C**). Esto podría ser por las mutaciones de las células tumorales que les confiere mayor capacidad de supervivencia celular y resistencia a los tratamientos. La línea celular HT-29, posee mutaciones en genes como APC, TP53 y PIK3CA (ATCC, 2022). Las mutaciones en el gen APC modifican la proliferación y diferenciación de las células. Este gen coopera con KRAS para modificar la dinámica celular en respuesta a inhibidores específicos, alterando la señalización de β -catenina, proteína esencial en la vía de señalización WNT (Clevers and Nusse, 2012; McCormick, 2015; Zhang and Shay, 2017). La vía de PI3K/AKT es fundamental en la progresión del cáncer, y su activación se ha relacionado con la alteración de las uniones estrechas en células tumorales. En la línea celular HT-29, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) induce la activación de esta vía, lo que genera cambios en la permeabilidad celular y contribuye potencialmente a la resistencia a quimioterapias como el oxaliplatino (Cao et al., 2013). Sin embargo, en estudios recientes han descubierto que se puede aumentar la sensibilidad de la línea celular HT-29 al bloquear la función transcripcional de la proteína mutante P53 mediante la proteína TRIM29. Proteína que al estar mutada pierde su capacidad para activar efectivamente mecanismos de respuesta al daño del ADN, lo que puede ayudar al efecto de los extractos con potencial anticancerígeno (Lei et al., 2021).

De la misma manera, la línea celular SW480 presenta mutaciones en los genes APC y KRAS. Estas mutaciones contribuyen a un fenotipo más resistente al afectar las vías de señalización que regulan la apoptosis y la proliferación celular

(Tomasetti et al., 2015). Investigaciones recientes han mostrado que los oligodesoxinucleótidos señuelo (ODN), que bloquean el activador de la transcripción 3 (STAT3), pueden reducir las propiedades metastásicas de SW480. Al combinar estas técnicas con extractos de potencial anticancerígeno, como los evaluados en nuestro estudio, se podría lograr citotoxicidad en este tipo de cáncer. Este enfoque propone nuevas estrategias para el tratamiento al centrarse en las adaptaciones moleculares que confieren resistencia en estas células tumorales (Asadi et al., 2021).

Por otro lado, en cuanto a los extractos de semilla y hoja, se han seleccionado los compuestos obtenidos con etanol al 40%, a pesar de que los resultados con etanol al 70% mostraron un mayor poder antioxidante. Esto se debe a que el etanol al 40% presenta toxicidad para las células, incluso después de eliminar el disolvente mediante liofilización.

Los resultados obtenidos con el extracto de semilla muestran una reducción viabilidad celular de manera dosis-dependiente, lo que indica una inhibición de la proliferación celular al incrementar las concentraciones del extracto de semilla. Se determinaron valores de CI₅₀ de $0,15 \pm 0,4$ mg/mL para la línea celular DLD-1, $0,15 \pm 0,4$ mg/mL para HT-29, $0,21 \pm 0,4$ mg/mL para SW480, y $0,31 \pm 0,4$ mg/mL para SW620 (**Figura 36**). Estudios previos evaluaron el extracto de semilla en la línea celular DLD-1, pero no lograron determinar el CI₅₀, concluyendo la necesidad de aumentar las dosis estudiadas (Wagner et al., 2023). Este es el primer reporte que muestra este nivel de bioactividad del extracto contra las líneas celulares evaluadas de cáncer colorrectal.

Por otro lado, el tratamiento prolongado de la exposición del extracto a línea celular metastásica SW620 (tratamiento durante dos meses y medio) con bajas dosis del extracto de semilla mostró una disminución en la viabilidad celular, indicando efectos acumulativos o sensibilizadores, como se observa en la (**Figura 37**). Este efecto podría deberse a que los extractos naturales tienen la capacidad de prevenir la tumorigénesis, inhibiendo la proliferación de células tumorales a través de la modulación de cascadas de señalización. Por ejemplo, se ha observado que el té verde induce la activación de la ruta de señalización p27, lo que contribuye a la

detención del ciclo celular y a la reducción del crecimiento tumoral (Kavanagh et al., 2001).

El tratamiento de la línea celular metastásica SW620 previamente expuestas al extracto de semilla, seguido de quimioterapia con oxaliplatino, muestra una reducción del CI50 en comparación con las células no tratadas previamente. La inhibición continua de la proliferación celular puede provocar que las células se adapten activando rutas de señalización alternativas, lo que las hace más vulnerables a la quimioterapia. Este posible efecto sinérgico podría estar mediado por la disminución significativa en la expresión del receptor RAGE, como se observó en nuestros análisis (**Figura 39**)

El receptor RAGE, conocido por su papel en la modulación de la inflamación y la supervivencia celular a través de la activación de vías de señalización como NF- κ B, podría estar contribuyendo a la resistencia a la quimioterapia en células tumorales (Jiao et al., 2011). Por lo tanto, la disminución de RAGE inducida por el extracto podría debilitar estas vías defensivas, haciendo a las células más susceptibles al daño inducido por oxaliplatino. Dado que la reducción de RAGE aumenta la sensibilidad a oxaliplatino, es importante realizar más experimentos para entender su rol específico. La manipulación de RAGE con siRNA o CRISPR-Cas9 podría determinar su influencia en la resistencia quimioterapéutica de las células SW620 y determinaría si efectivamente modula la respuesta a oxaliplatino. Esta validación podría apoyar la efectividad de nuevas estrategias terapéuticas combinadas para el cáncer colorrectal. Lo que se conoce hasta ahora, es que al silenciar RAGE en tumores, causa inhibición de la capacidad de formación de colonias, proliferación, migración y el potencial invasivo (Yu et al., 2017).

En el caso del tratamiento con el extracto de hoja, las líneas celulares mostraron variaciones en la respuesta en los ensayos de viabilidad. Los valores de CI50 oscilaron entre 0,97 y 1,51 mg/mL, como se detalla en la **Figura 44**. Esta diferencia muestra la heterogeneidad en la susceptibilidad de las células colorrectales a tratamientos basados en compuestos naturales. Estudios previos evaluaron el extracto de hoja (obtenido con etanol y metanol) en la línea celular HT-29, pero no lograron determinar su CI50 (Wagner et al., 2023). Esta es la primera vez que se

reporta la bioactividad de este extracto en las líneas evaluadas de cáncer colorrectal.

La exposición del extracto de hoja a bajas dosis durante un mes y medio en la línea celular metastática SW620, permitió observar cambios en el patrón de la proliferación celular a lo largo del tiempo. La **Figura 45** muestra un crecimiento celular similar al del control durante los primeros días, pero la proliferación de la línea tratada con extracto de hoja se detuvo por completo en el día 49, lo que resultó en muerte celular. Este resultado sugiere un posible efecto citostático del extracto, que podría estar relacionado con la interrupción de las rutas de señalización de la división celular. La detención prolongada del ciclo celular puede haber inducido estrés en las células, agotando sus mecanismos de reparación y llevando eventualmente a la apoptosis (Pollak et al., 2021). Este efecto podría explicarse por la presencia de compuestos bioactivos identificados en el extracto de semilla, como el catecol y el ácido hexadecanoico, los cuales son conocidos por su capacidad para modular proteínas en la regulación del ciclo celular. Estos compuestos inducen daño en el ADN a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que desencadena mecanismos proapoptóticos que culminan en la muerte celular. La capacidad de estos compuestos para alterar las vías de señalización celular es fundamental para su potencial como agentes anticancerígenos, tal como se ha demostrado en estudios previos (Yu et al., 2019; Vazhappilly et al., 2021). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar la vía exacta mediante la cual actúa el extracto y si este efecto citostático es específico de la línea celular evaluada o generalizable a otras líneas tumorales.

Por otro lado, los análisis de citometría de flujo no mostraron cambios significativos en los biomarcadores estudiados (BCRP1, AC133, CD133, LGR5, CD166, CD34, EPCAM, CD36, CD44V6 y TROP2) (**Figura 46**). Lo que indica que los efectos del extracto sobre la viabilidad y el crecimiento celular podrían no estar mediados por las vías comúnmente asociadas con estos biomarcadores. Los cambios moleculares pueden ser sutiles y difíciles de detectar con las técnicas empleadas. Esto recalca la necesidad de utilizar métodos adicionales, como análisis genómicos y proteómicos, para identificar cambios específicos inducidos por el extracto.

La falta de cambios significativos en biomarcadores habituales también sugiere que el extracto podría actuar a través de mecanismos menos conocidos, lo que sería relevante para el desarrollo de terapias antitumorales basadas en componentes naturales. Futuras investigaciones deberían enfocarse no solo en confirmar estos efectos en modelos *in vivo*, sino también en explorar los mecanismos moleculares implicados para mejorar el entendimiento y la aplicación terapéutica de estas sustancias.

6.3.3. Efecto inmunomodulador

La búsqueda de estrategias efectivas para prevenir y tratar enfermedades infecciosas es más relevante que nunca. Los patógenos resistentes y las nuevas enfermedades representan una amenaza global. Esto impulsa a la ciencia a explorar alternativas sostenibles y accesibles para fortalecer el sistema inmunitario. Las células T son esenciales para la inmunidad celular, atacando patógenos y células infectadas. Las células B, por otro lado, producen anticuerpos que neutralizan los patógenos y sus toxinas. En este contexto, los productos naturales se destacan como candidatos prometedores por su capacidad inmunoestimulante y su baja probabilidad de generar resistencia, en comparación con las terapias farmacológicas tradicionales.

La inclusión de alimentos ricos en compuestos inmunoestimulantes podría reducir la incidencia de enfermedades virales como la gripe (virus influenza), que afecta a millones de personas anualmente con hasta 650.000 muertes relacionadas con enfermedades respiratorias cada año según la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2023). Las infecciones bacterianas recurrentes, como las infecciones urinarias y respiratorias, podrían ser gestionadas más eficazmente con una mejora en la inmunidad natural.

Además, enfermedades emergentes como COVID-19, que ha provocado una crisis de salud pública global, demuestra la necesidad crítica de fortalecer las defensas naturales del cuerpo a través de la dieta y otros medios naturales. Esta perspectiva no solo es crucial para la prevención inmediata, sino también para la resiliencia a largo plazo frente a futuros brotes infecciosos.

Diferentes estudios muestran la capacidad de polifenoles para inmunomodular la respuesta linfocitaria. Por ejemplo, el EGCG que logra reducir el número de linfocitos T (D'Arena et al., 2013). La curcumina también es capaz de inmunomodular linfocitos, elevando el número de células Th1 y disminuyendo las T (Zou et al., 2018; Shafabakhsh et al., 2019).

Con el objetivo de evaluar si *S. dulcificum* fortalece el sistema inmunitario, se analizó el comportamiento de células T (CD3+, CD4+, CD8+) y células B (CD19+) frente a extractos de distintas partes de la planta. Los resultados preliminares muestran que el extracto acuoso de DMB® (**Figura 33**), junto con el extracto de semilla (**Figura 40**) y el de hoja (**Figura 47**) incrementan las células CD3+ y las subpoblaciones Th (CD4+) y citotóxicas (CD8+), aunque en diferentes niveles. Estas células T especializadas son cruciales en la respuesta inmunitaria adaptativa (Lim et al., 2022). No se observó aumento en las células productoras de anticuerpos (CD19+), lo que sugiere una activación orientada más hacia una respuesta celular que humoral, es decir, centrada en la defensa contra infecciones (Hillion et al., 2020).

La estimulación de la inmunidad adquirida suele ocurrir en respuesta a infecciones o vacunas, lo que desencadena una respuesta específica del sistema inmunitario. En este estudio, se observó una actividad similar en las células inmunitarias. El mantenimiento estable de células CD19+ sugiere que la estimulación es predominantemente celular, descartando una activación inmune relacionada con toxinas o antígenos externos. Esto refuerza la idea de que la respuesta observada está dirigida a la activación de las células T, más que a una proliferación general de anticuerpos. Sin embargo, las futuras investigaciones deberán evaluar las inmunoglobulinas (Ig) y otros marcadores como el CD28, para indicar qué tipo de células T y presentadoras de antígeno son activadas, y así confirmar esta tendencia (Esensten et al., 2016; Joglekar et al., 2019; Sun et al., 2020). Además, el estudio de células reguladoras T (Tregs) y su función en la modulación de la respuesta inmunitaria podría proporcionar información adicional sobre cómo los agentes inmunoestimulantes naturales afectan la tolerancia inmunológica y la autoinmunidad.

Evaluar niveles elevados de IL-2, IL-6, o IL-17 también confirmaría una estimulación inmunitaria más robusta, asociada con una activación intrínseca del sistema inmunitario celular ya que estos influyen en la inflamación y la inmunidad anti-patógenos (Malek, 2008; Tanaka et al., 2014; Mills, 2023).

Para confirmar la ausencia de una respuesta humoral, se puede evaluar el perfil de citoquinas como IL-4 , IL13 (Wynn, 2003) o el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF(Christopher et al., 2011).

La integración de estos resultados con modelos de enfermedad in vivo y estudios clínicos será crucial para trasladar estos hallazgos del laboratorio a la práctica clínica, con el objetivo de desarrollar intervenciones que aprovechen el potencial de la inmunomodulación para mejorar los resultados en pacientes.

En resumen, utilizando técnicas avanzadas como el modelado matemático y la aplicación de disolventes eutécticos naturales profundos (NaDES), se logró una mejor comprensión de la extracción de los compuestos con capacidad antioxidante.

Además, se ha demostrado las propiedades de diferentes partes de la planta *S. dulcificum*, como la capacidad antioxidante, su bioactividad en líneas celulares de cáncer colorrectal y la capacidad del extracto acuoso para incrementar células T especializadas.

Estos resultados destacan la importancia de una evaluación integral de los extractos naturales, considerando tanto su potencial biológico como su perfil de seguridad. A continuación, se presentan las conclusiones detalladas y las implicaciones de estos resultados para futuras investigaciones y aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica u otras.

6.4. Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NaDES) una alternativa innovadora para la obtención de compuestos fenólicos.

6.4.1. Capacidades antioxidantes de DMB® y frutas varias mediante NaDES.

Se elaboraron 31 tipos de NaDES y se obtuvieron los compuestos fenólicos de 31 frutas diferentes, cuantificando el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Los NaDES han sido propuestos como una alternativa ecológica y efectiva para la extracción de compuestos bioactivos, incluyendo antioxidantes, debido a su capacidad de disolver una amplia gama de metabolitos secundarios. En este caso, los resultados muestran que los NaDES extrajeron compuestos con mayor capacidad antioxidante que el etanol al 70%, excepto en los casos de DMB®, Açai y Maqui. Esto puede deberse a la alta concentración de antocianinas en estas frutas (Nowak et al., 2018), las cuales presentan una mayor afinidad por disolventes como el etanol, que favorecen su extracción debido a su carácter menos polar, en comparación con los NaDES, que son más polares. Aunque los NaDES son una opción prometedora y ecológica, su eficiencia varía según la composición química del compuesto extraído (Leng and Suyin, 2019). Este resultado destaca la importancia de adaptar la composición de los NaDES para optimizar la extracción de compuestos con capacidad antioxidante según las particularidades de cada fruta. Para mejorar la obtención de estos compuestos con capacidad antioxidante se puede incluir diferentes combinaciones de NaDES y ajustar parámetros como la temperatura y el pH. Utilizar técnicas de ultrasonido o microondas puede mejorar la extracción.

Al igual que en este estudio, otros trabajos han demostrado que los NaDES son más eficaces que los disolventes orgánicos como por ejemplo: orujo de oliva, aronia negra, cáscara de naranja y piel de uva (Cvjetko Bubalo et al., 2016; Chanioti and Tzia, 2018; Razboršek et al., 2020; Bertolo et al., 2021).

En relación con DMB®, aunque todos los NaDES evaluados mostraron menor capacidad antioxidante que el etanol al 70% (102 μmol trolox/g muestra seca), 13 de estos disolventes no presentaron diferencias significativas en comparación con el etanol al 70% (**Figura 51**). Entre los NaDES, el número 24 destacó con un valor de 97.57 μmol de trolox/gramo de muestra seca. Este valor es similar al del etanol, lo que sugiere que NaDES podría ser una alternativa más sostenible y segura para la extracción de antioxidantes.

En el futuro, sería interesante caracterizar los NaDES mediante técnicas como FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier) y Espectroscopía Raman, para identificar los enlaces de hidrógeno que se generan entre los compuestos.

6.4.2. Obtención de Miraculina con NaDES

Los extractos de DMB® obtenidos con NaDES se visualizaron y cuantificaron mediante la técnica de Western Blot para detectar la proteína miraculina. Como control positivo, se utilizó un tampón proporcionado por Medicinal Gardens, el cual es empleado actualmente para la extracción de miraculina (Menéndez Rey, 2021).

Aunque Western Blot no es una técnica cuantitativa, se realizó una cuantificación relativa al control interno de cada membrana. Tras realizar tres experimentos, se observó que ciertos NaDES, como el NaDES 27 presentaron una mayor capacidad de extracción de miraculina en comparación con el tampón comercial (**Figura 50**). Por lo tanto, el NaDES-27 podría mejorar la solubilidad de la miraculina gracias a su carácter iónico.

La capacidad de los NaDES para extraer eficientemente compuestos fenólicos y proteínas abre nuevas oportunidades en biotecnología y la industria alimentaria. No obstante, es fundamental realizar estudios adicionales que optimicen las condiciones de extracción. Factores como el tiempo, la temperatura y la proporción muestra/solvente pueden afectar significativamente la eficiencia de la extracción y la integridad de los compuestos extraídos. Además, es importante evaluar la seguridad alimentaria bajo cada condición experimental (Nacional et al., 2024).

6.5. Aplicación del uso de los NaDES. Modelamiento de Machine Learning

no de los objetivos de este estudio fue predecir la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos que los NaDES pueden extraer de diversas frutas, con el fin de optimizar el proceso de extracción y desarrollar nuevos suplementos alimenticios. Dado que la empresa ya posee información detallada sobre las características nutricionales de las frutas que comercializa, esta información se utilizó como punto de partida para predecir qué NaDES sería más eficiente en la extracción de compuestos fenólicos específicos para cada fruta. Esta predicción tiene que ser un valor continuo, específicamente un problema de regresión, motivo por el que se utilizaron algoritmos de Machine Learning de aprendizaje supervisado.

Los algoritmos de aprendizaje supervisado no lograron predecir la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos mediante NaDES usando únicamente las características de las frutas. Las métricas de evaluación, que miden la calidad de las predicciones, no alcanzaron los valores establecidos (**Tabla 13**). Estos resultados indican que, por ahora, no es posible predecir la capacidad antioxidante de los compuestos obtenido basándose solo en las propiedades nutricionales de las frutas. Esto puede deberse a la insuficiencia de datos, la complejidad de la relación entre las variables o la falta de inclusión de otras variables relevantes. Por este motivo, se optó por emplear algoritmos de aprendizaje no supervisado.

Los algoritmos de *machine learning* no supervisado identifican patrones ocultos en los datos y los agrupan en conjuntos llamados "clústeres". Esta estrategia facilita la comprensión de relaciones entre los parámetros que tenemos y permite detectar características comunes entre ellos, lo que nos sirve para la toma de decisiones. En este estudio, se aplicaron los modelos de k-medias y agrupación jerárquica, los cuales ayudaron a mostrar nuevas conexiones entre las variables analizadas

6.5.1. Agrupación de frutas según las propiedades nutricionales.

Se utilizaron los algoritmos de clustering k-medias y clustering jerárquico para agrupar las frutas según sus propiedades nutricionales y se visualizaron con un diagrama de cajas y bigotes (boxplot). Estas herramientas sugirieron dividir las frutas en tres clústeres, con un valor de silueta de 0.368 (**Tabla 14**). Aunque el índice de silueta más alto se obtuvo con cinco clústeres, se observó mediante agrupación jerárquica que, a partir de cuatro clústeres, las frutas se separaban individualmente. Por esta razón, se decidió utilizar tres clústeres para los análisis posteriores, balanceando la calidad del agrupamiento y la interpretabilidad de los resultados.

Mediante el diagrama de caja y bigotes, se observó que las propiedades más relevantes para la formación de los clústeres fueron la glicina y los fitoesteroles totales. Los clústeres mostraron un análisis de varianza (ANOVA) F 54,9 y 34,0, respectivamente; y ambos con un valor p menor de 10^{-4} (**Figura 57**). Estos resultados indican que las diferencias entre los clústeres son estadísticamente significativas, demostrando la efectividad en la agrupación de datos.

Agrupar las frutas mediante fitoesteroles o glicina podrían ser de ayuda en distintas áreas de interés. Los fitoesteroles, conocidos por reducir los niveles de colesterol LDL en la sangre, pueden disminuir el riesgo de enfermedades cardíacas. Agrupar frutas basándose en estos compuestos puede ayudar a diseñar dietas específicas que promuevan la salud cardiovascular (Marangoni and Poli, 2010). La glicina, un aminoácido no esencial, juega un papel crucial en la síntesis proteica, el metabolismo y la regulación de los sistemas inmunológico y digestivo (Razak et al., 2017). Agrupar frutas por su contenido de glicina puede ayudar a identificar aquellas especialmente beneficiosas para la salud nutricional.

Las pruebas post hoc de DMS (Duncan's Multiple Range Test) mostraron que las frutas con altos niveles de glicina y fitoesteroles, agrupadas en el clúster 2, tienen una capacidad antioxidante significativamente mayor en comparación con las frutas agrupadas en los clústeres 1 y 3, que presentan niveles bajos o medios de estos compuestos. Esto puede atribuirse a las propiedades antioxidantes de la

glicina, que contribuye a la síntesis de glutatión, un antioxidante clave en el cuerpo, y a los fitoesteroles, que son conocidos por sus efectos beneficiosos en la reducción del colesterol, y que también posee capacidad para combatir el estrés oxidativo (Ruiz-Ramírez et al., 2014; Sharma et al., 2021).

6.5.2. Agrupación de frutas según su capacidad antioxidante obtenida mediante NaDES.

Anteriormente se analizaron clústeres generados a partir de las propiedades nutricionales de las frutas. Ahora se buscó analizar la agrupación de las frutas en función de la capacidad de los compuestos fenólicos extraídos mediante distintos NaDES. De igual modo, se utilizaron los algoritmos de *clustering* k-medias y agrupación jerárquica para agrupar las frutas según su capacidad antioxidante, determinada por los compuestos fenólicos obtenidos con estos disolventes. Este análisis permitió observar patrones de extracción relacionados con la efectividad de los NaDES en diferentes tipos de frutas.

Se utilizó el índice de silueta, para evaluar la calidad de los clústeres generados. Índice que mide la coherencia interna de las agrupaciones formadas. Los valores obtenidos indicaron que las mejores configuraciones correspondían a la agrupación de las frutas en 2 y 3 clústeres, con valores de 0,468 y 0,400 respectivamente. Si bien el índice de silueta mostró que dos clústeres proporcionaban la mejor separación, ya que posee el valor más alto, se optó por continuar con tres clústeres, ya que el tercero incluía las frutas guaraná, maqui y arándano, frutas conocidas por su alta capacidad antioxidante. Al lograr separar las frutas en clústeres basados en su capacidad antioxidante, como guaraná, maqui y arándano se cumple con el objetivo principal de este estudio, que era diferenciar las frutas según esta propiedad. Esta clasificación no solo valida la metodología empleada, sino que también proporciona una base para comprender mejor las relaciones entre los clústeres y realizar análisis más profundos sobre sus propiedades nutricionales.

Al analizar la distribución de las frutas mediante gráficos de caja (box plot), se observó que los disolventes NaDES 9 y NaDES 16 influyeron significativamente en la agrupación de las frutas. Estos disolventes mostraron mayor relevancia en la

formación de clústeres en comparación con otros disolventes, que también generaron agrupaciones con diferencias estadísticas. Sin embargo, NaDES 9 y NaDES 16 presentaron un ANOVA más alto, lo que indica una mayor variabilidad explicada en la distribución de las frutas dentro de los clústeres.

Los tres clústeres generados de las frutas se categorizaron en grupos de bajo (5% a 15%), media (29% a 50%) y alta (74% a 90%) capacidad de inhibición al radical DPPH. Esto indica que los disolventes NaDES 9 y NaDES 16 no solo son efectivos para categorizar frutas según su capacidad antioxidante, sino que también pueden ser usadas como herramientas valiosas para la empresa en su búsqueda continua de nuevas frutas con alto potencial. La aplicación de estos NaDES podría facilitar la identificación y clasificación de frutas prometedoras, contribuyendo así a la innovación y al desarrollo de productos en el ámbito comercial.

Además, se evaluó el disolvente convencional etanol al 70% para determinar su eficacia en la agrupación de frutas según su capacidad antioxidante. Los resultados mostraron que este disolvente también logró una distribución óptima de las frutas en tres clústeres, similar a lo observado con los disolventes NaDES. Los grupos formados presentaron diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $F = 35,41$ y $p < 10^{-4}$, lo que confirma la robustez del método de clasificación empleado. Los clústeres identificados mediante etanol al 70% permitieron clasificar las frutas en categorías de baja, media y alta capacidad antioxidante, con rangos de 1% a 10% para el grupo F1 (color azul), de 27% a 47% para el grupo F2 (color rojo), y de 62% a 82% para el grupo F3 (color verde).

Los resultados obtenidos tanto con los disolventes NaDES como con etanol al 70% demuestran su capacidad para agrupar frutas según su capacidad antioxidante. Estos resultados sugieren que ambos enfoques son comparables, a pesar de las diferencias entre un disolvente convencional y los NaDES, que son opciones más avanzadas. La clasificación de las frutas en tres clústeres basados en la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos por NaDES 9, NaDES 16 y etanol al 70% indica que este método es eficaz para distinguir entre diferentes niveles de actividad antioxidante. Este enfoque podría aplicarse en estudios futuros para clasificar nuevas frutas en tres rangos: baja capacidad antioxidante

(1% a 20%), capacidad media (21% a 60%) y alta capacidad (61% a 100%). Estos rangos son consistentes con otros estudios que evalúan la actividad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH. Por ejemplo, investigaciones como la de Loh et al. (2022), sobre inhibidores de la xantina oxidasa en flores de *Chrysanthemum morifolium* Ramat, consideran que una baja actividad antioxidante se sitúa entre 0% y 40%, una actividad moderada entre 41% y 70%, y una actividad alta entre 71% y 100% (Loh et al., 2022)

La utilización de métodos estandarizados para cuantificar la capacidad antioxidante de suma importancia, como lo destacan Yamauchi et al., 2024. Técnicas estandarizadas permiten minimizar errores y mejorar la comparabilidad entre estudios. En este contexto, nuestro estudio propone una metodología para cuantificar y clasificar la capacidad antioxidante de las frutas, utilizando rangos previamente definidos. En contraste, una manera de mejorar la cuantificación de la capacidad antioxidante es la incorporación de la monitorización del consumo del DPPH evaluando su cinética de reacción. Este método mejora la estandarización del ensayo al considerar reacciones secundarias y la influencia de diferentes disolventes en la medición de la actividad antioxidante como lo demuestra en el estudio de Angeli et al., 2021.

Frutas como el açaí, guaraná y maqui demostraron altos niveles de capacidad antioxidante con ambos disolventes, NaDES y etanol al 70%, lo que sugiere una capacidad antioxidante intrínseca accesible mediante diferentes métodos de extracción. Sin embargo, los compuestos extraídos con etanol al 70% de frutas como limón, acerola y aguacate no mostraron capacidad antioxidante, mientras que los extraídos con NaDES sí lo hicieron. Esto indica que los NaDES son más eficaces para extraer compuestos antioxidantes de ciertas frutas, posiblemente debido a su capacidad para disolver una gama más amplia de metabolitos secundarios. Un patrón similar se observó en arándano y frambuesa, donde los NaDES extrajeron compuestos con mayor capacidad antioxidante que el etanol al 70%. En general, los NaDES resultaron ser más efectivos para extraer antioxidantes de la mayoría de las frutas estudiadas, destacando NaDES 24 y NaDES 27, que lograron extraer

altos niveles de compuestos antioxidantes de frutas como acerola, arándano, frambuesa, fresa y manzana.

Finalmente, las pruebas post hoc de DMS mostraron que el grupo F2, caracterizado por su alta capacidad antioxidante, presenta niveles significativamente más altos de proteínas, energía, zinc y fósforo en comparación con los grupos F1 (baja capacidad antioxidante) y F3 (capacidad antioxidante media) (**Figura 64**). Este hecho sugiere que la relación observada entre la capacidad antioxidante y el contenido nutricional podría implicar que la selección de alimentos basados en su capacidad antioxidante no solo mejora la defensa contra el daño oxidativo, sino que también podría ser una estrategia efectiva para mejorar la calidad nutricional de la dieta. Sin embargo, aunque los resultados sugieren una correlación significativa, es crucial considerar la naturaleza multifactorial de las propiedades nutricionales y antioxidantes. Factores como la variedad genética de los alimentos, las condiciones de cultivo y los métodos de procesamiento también podrían influir en estos resultados.

6.5.3. Agrupación de NaDES según su capacidad de extracción de capacidad antioxidante según el tipo de fruta.

Hasta ahora se han agruparon las frutas según sus propiedades nutricionales y su capacidad antioxidante, obtenida con diferentes NaDES y etanol al 70%. Sin embargo, también se analizó cómo se distribuyen los disolventes NaDES en relación con los compuestos antioxidantes que lograron extraer. Este análisis permitió observar que NaDES son más efectivos en la extracción de compuestos con capacidad antioxidantes y cuales están relacionados entre sí, lo que resalta la variabilidad en la eficacia de los disolventes para captar diferentes metabolitos secundarios.

Mediante las técnicas de agrupación jerárquica y los diagramas de cajas y bigotes, se observó que frutas como el arándano y guaraná influyeron significativamente en la distribución de los NaDES en tres clústeres. Los rangos de inhibición de DPPH obtenidos por los NaDES fueron del 1% al 50% en el grupo N1, del 60% al 80% en el grupo N2, y del 84% al 90% en el grupo N3. Estos resultados sugieren

que estas frutas juegan un papel clave en la clasificación de los NaDES. Esta información es útil para el desarrollo de nuevos NaDES, ya que permite anticipar su eficacia en la extracción de compuestos antioxidantes. Además, este hallazgo resalta la importancia del disolvente en la extracción de compuestos bioactivos, ya que influye directamente en la capacidad antioxidante de los extractos. Para futuros análisis, evaluar la composición de cada NaDES ayudaría a identificar los compuestos estrechamente relacionados con la extracción de compuestos bioactivos.

En la **Figura 70**, se presenta un esquema que ofrece una guía visual que facilita la comprensión del proceso de toma de decisiones basado en los resultados obtenidos. El diagrama presenta tres agrupaciones diferentes. Primero, agrupa las frutas por su contenido en glicina y fitoesteroles, destacando su relevancia nutricional. Segundo, muestra la capacidad antioxidante usando etanol al 70% y NaDES, evaluada mediante la inhibición del DPPH. Las frutas se categorizan en rangos de baja a alta capacidad, lo que ayuda a determinar las condiciones óptimas de extracción. Tercero, incluye recomendaciones sobre el uso de NaDES para la obtención del potencial antioxidante de las frutas, utilizando la guaraná como un “bioclasificador” para los NaDES.

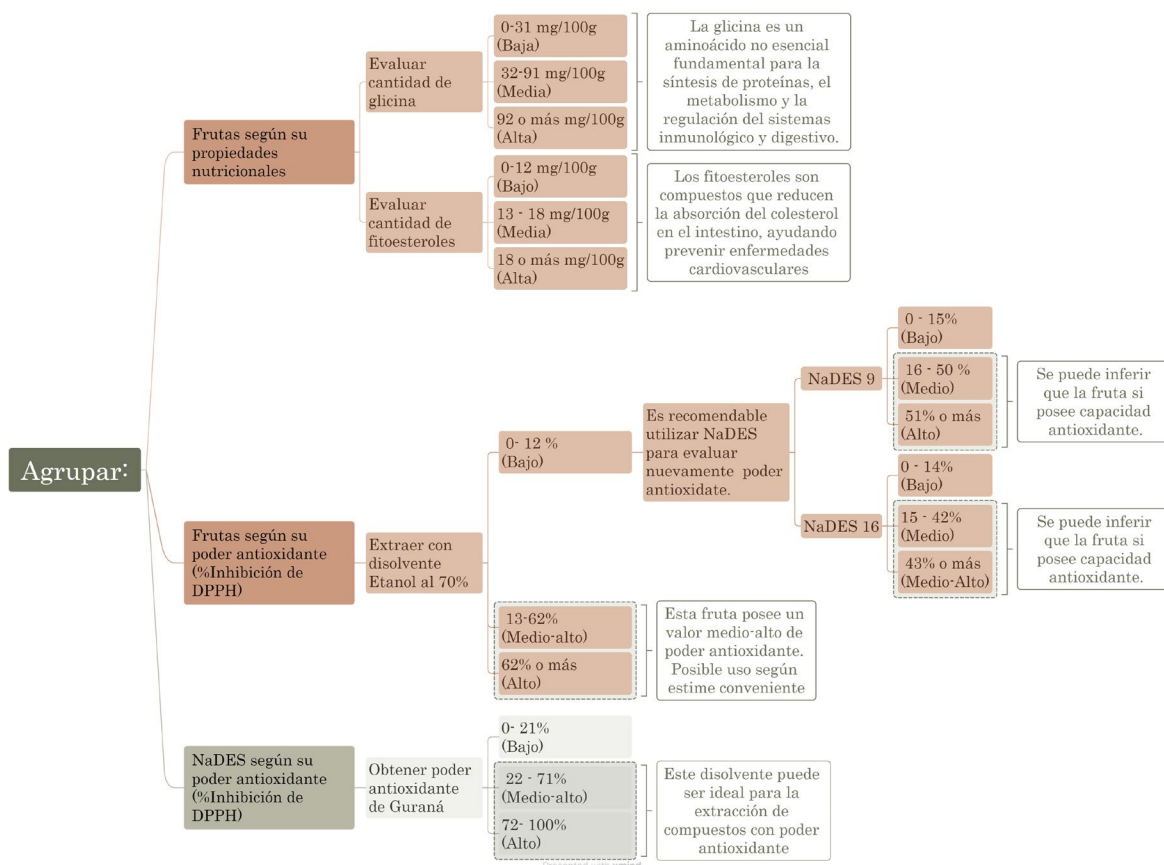


Figura 70 | Esquema resumen del proceso de toma de decisiones obtenido mediante aprendizaje no supervisado.

Actualmente, existen varios modelos predictivos centrados en determinar las propiedades de las plantas para aprovechar sus compuestos. Cada uno de estos modelos se especializa en diferentes aspectos, ya sea en la selección de disolventes o en la identificación de compuestos de interés. Los resultados de nuestro estudio podrían complementar dichos modelos, aportando información sobre la capacidad antioxidante y la eficiencia de los NaDES. Sin embargo, los modelos actuales no están diseñados para predecir específicamente la capacidad antioxidante ni para evaluar la efectividad de los NaDES.

Algunos modelos incluyen las características dinámicas de cada molécula presente en la fruta, lo que podría mejorar la precisión de las predicciones, como señalan en diferentes investigaciones. Además, una posible mejora sería categorizar las

familias fenólicas en los extractos para predecir mejor la capacidad antioxidante (Wright et al., 2001; Kumar et al., 2014; Lam et al., 2020).

Modelos cercanos a nuestro enfoque, como COSMO-RS, predicen el equilibrio termodinámico en fluidos para diseñar disolventes con características funcionales deseadas. Otros modelos, utilizan espectroscopia de infrarrojo para determinar el contenido total de fenoles y flavonoides en frutas y hortalizas, lo que guarda relación con este trabajo (Eckert and Klamt, 2002; Kusumiyati and Asikin, 2023).

Por otro lado, algunos modelos priorizan la evaluación de antioxidantes proteicos en lugar de polifenoles vegetales. Un ejemplo es el algoritmo AnOxPePred, entrenado con datos peptídicos y utilizando k-Nearest Neighbors para analizar la secuencia de aminoácidos, determinando el nivel de quelación de radicales libres (Olsen et al., 2020). Además, modelos creados con Weka y Random Forest han logrado identificar proteínas con alto rendimiento antioxidante, alcanzando una precisión del 84.6% y una especificidad del 85.1% (Lam et al., 2020).

7. Conclusiones

1. El etanol al 70% con una proporción 1:10 p/v y 1 hora de extracción, resultó ser la condición óptima para la extracción de compuestos con capacidad antioxidante en DMB® comparado con disolventes hidroetanólicos.
2. La espectrometría de gases acoplada a masas permitió identificar hasta 16 compuestos fenólicos en extractos de DMB®, 12 en semillas y 5 en hojas, compuestos con potencial uso en industria farmacéutica y alimentaria.
3. En el extracto de DMB® se han identificado 12 compuestos fenólicos mediante HPLC. Obteniendo mayor cantidad de compuestos en el extracto acuoso al comparar con etanol al 30, 50% y 70%.
4. Los extractos de DMB®, semilla y hoja mostraron efectos citotóxicos en distintas líneas celulares de cáncer colorrectal (DLD-1, HT-29, SW480, SW620) alcanzando una reducción del 50% en la viabilidad celular, lo que sugiere su potencial uso en aplicaciones anticancerígenas.
5. El tratamiento crónico con extractos de DMB® logró reducir en un 77% el CI50 del oxaliplatino en una línea celular metastásica (SW620), lo que podría disminuir la toxicidad y mejorar la eficacia de este quimiofármaco.
6. El extracto de semilla logró reducir los niveles del biomarcador tumoral de superficie RAGE en una línea celular metastásica (SW620) con tratamiento crónico, lo que sugiere una acción específica sobre ciertas vías moleculares.
7. Los extractos de DMB®, hoja y semilla lograron estimular las células linfocíticas T, lo que podría tener aplicación en el desarrollo de nuevas terapias inmunomoduladoras o como suplemento alimenticio.
8. El extracto acuoso de DMB® no mostró efectos adversos en las pruebas de hemaglutinación y hemólisis, lo que respalda su potencial como ingrediente funcional en la industria alimentaria. Sin embargo, los extractos de semilla y hoja generaron hemólisis, por lo que su aplicación debe ir encaminada al área farmacéutica.

9. Los NaDES demostraron ser eficaces en la extracción de compuestos con capacidad antioxidante superando el rendimiento del disolvente etanol al 70% en la mayoría de las frutas estudiadas.
10. Los NaDES obtuvieron más proteína miraculina en comparación con el tampón de extracción proteica, en especial el NaDES 27.
11. Los modelos supervisados evaluados no lograron predecir la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos obtenidos con los NaDES basándose únicamente en las características nutricionales. Sin embargo, los modelos no supervisados permitieron generar clústeres con relación a las propiedades nutricionales y la capacidad antioxidante de las frutas evaluadas.
12. El análisis de los clústeres mostró que las frutas que poseen cantidades elevadas de glicina y fitoesteroles totales presentan compuestos con mayor capacidad antioxidante.
13. El cluster de las frutas con compuestos con mayor capacidad antioxidante contienen un mayor contenido de macronutrientes (energía y proteína) y micronutrientes (zinc y fósforo).

8. Referencias

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. 2017. Natural polyphenols: An overview. *Int J Food Prop* 20:1689–1699.
- Achigan-Dako EG, Tchokponhoué DA, N'Danikou S, Gebauer J, Vodouhè RS. 2015. Current knowledge and breeding perspectives for the miracle plant *Synsepalum dulcificum* (Schum. et Thonn.) Daniell. *Genet Resour Crop Evol* 62:465–476.
- Aesan. 2024. Legistación Seguridad Alimentaria.
- Ahmad A, Ahmad V, Zamzami MA, Chaudhary H, Baothman OA, Hosawi S, Kashif M, Akhtar MS, Khan MJ. 2021. Introduction and Classification of Natural Polyphenols. *Polyphenols-based Nanotherapeutics Cancer Manag*:1–16.
- Alara OR, Abdurahman NH. 2019. Kinetics studies on effects of extraction techniques on bioactive compounds from *Vernonia cinerea* leaf. *J Food Sci Technol* 56:580–588.
- Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. 2018. Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *J Appl Res Med Aromat Plants* 11:12–17.
- Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. 2021. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* 4:200.
- Ali J, Tuzen M, Kazi TG. 2020. Green and innovative technique develop for the determination of vanadium in different types of water and food samples by eutectic solvent extraction method. *Food Chem* 306:125638.
- Ali Redha A. 2021. Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *J Agric Food Chem* 69:878–912.
- Angeli L, Imperiale S, Ding Y, Scampicchio M, Morozova K. 2021. A novel stoichiometric model for the DPPH• assay: The importance of the side reaction and

- application to complex mixtures. *Antioxidants* 10:1019.
- Aparna V, Dileep K V., Mandal PK, Karthe P, Sadasivan C, Haridas M. 2012. Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chem Biol Drug Des* 80:434–439.
- Armstrong D. 2002. Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols. *Oxidative Stress Biomarkers Antioxid Protoc.*
- Asadi Z, Fathi M, Rismani E, Bigdelou Z, Johari B. 2021. Application of decoy oligodeoxynucleotides strategy for inhibition of cell growth and reduction of metastatic properties in nonresistant and erlotinib-resistant SW480 cell line. *Cell Biol Int* 45:1001–1014.
- ATCC. 2022. Colon cancer panels 1 and 2. *Cell Panel*:1–2.
- Ausina P, Branco JR, Demaria TM, Esteves AM, Leandro JGB, Ochioni AC, Mendonça APM, Palhano FL, Oliveira MF, Abou-Kheir W, Sola-Penna M, Zancan P. 2020. Acetylsalicylic acid and salicylic acid present anticancer properties against melanoma by promoting nitric oxide-dependent endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Sci Rep* 10.
- Ávila-Gálvez MÁ, González-Sarrías A, Martínez-Díaz F, Abellán B, Martínez-Torrano AJ, Fernández-López AJ, Giménez-Bastida JA, Espín JC. 2021. Disposition of Dietary Polyphenols in Breast Cancer Patients' Tumors, and Their Associated Anticancer Activity: The Particular Case of Curcumin. *Mol Nutr Food Res* 65.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014.
- Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, Zhang Y, Wang X, Meng X. 2021. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed Pharmacother* 133.
- Bakirtzi C, Triantafyllidou K, Makris DP. 2016. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of

- antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants* 3:120–127.
- Bartel I, Mandryk I, Horbańczuk JO, Wierzbicka A, Koszarska M. 2023. Nutraceutical Properties of Syringic Acid in Civilization Diseases-Review. *Nutrients* 16.
- Bastian P, Dulski J, Roszmann A, Jacewicz D, Kuban-Jankowska A, Slawek J, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. 2021. Regulation of Mitochondrial Dynamics in Parkinson's Disease—Is 2-Methoxyestradiol a Missing Piece? *Antioxidants* 2021, Vol 10, Page 248 10:248.
- Becker LC, Bergfeld WF, Belsito D V., Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Gill LJ, Heldreth B. 2019. Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol* 38:6S-22S.
- Behera P, Balaji S. 2021. The forgotten sugar: A review on multifarious applications of melezitose. *Carbohydr Res* 500:108248.
- Bell H. 2004. William Freeman (1817–1865). *Oxford Dict Natl Biogr.*
- Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. 2018. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules* 23.
- Bertolo MRV, Martins VCA, Plepis AMG, Bogusz S. 2021. Utilization of pomegranate peel waste: Natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds. *J Clean Prod* 327:129471.
- BOE.es. 2021. DOUE-L-2021-81528 Reglamento de Ejecución (UE) 2021/1974.
- Brolony MA, Stainier DYR. 2017. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 13.
- Broner EC, Trujillo JA, Korzinkin M, Subbannayya T, Agrawal N, Ozerov I V., Zhavoronkov A, Rooper L, Kotlov N, Shen L, Pearson AT, Rosenberg AJ, Savage PA, Mishra V, Chatterjee A, Sidransky D, Izumchenko E. 2021. Doublecortin-Like Kinase 1 (DCLK1) Is a Novel NOTCH Pathway Signaling Regulator in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 11:1.
- Brouwer JN, Glaser D, af Segerstad CH, Hellekant G, Ninomiya Y, van der Wel

- H. 1983. The sweetness-inducing effect of miraculin; behavioural and neurophysiological experiments in the rhesus monkey *Macaca mulatta*. *J Physiol* 337:221–240.
- Brown N, John JA, Shahidi F. 2019. Polyphenol composition and antioxidant potential of mint leaves. *Food Prod Process Nutr* 1:1–14.
- Burns TA, Kadegowda AKG, Duckett SK, Pratt SL, Jenkins TC. 2012. Palmitoleic (16:1 cis-9) and cis-vaccenic (18:1 cis-11) acid alter lipogenesis in bovine adipocyte cultures. *Lipids* 47:1143–1153.
- Butler M, Spearman M. 2007. Cell Counting and Viability Measurements. In: Humana Press. p 205–222.
- Cadena-Iñiguez J, Santiago-Osorio E, Sánchez-Flores N, Salazar-Aguilar S, Soto-Hernández RM, Riviello-Flores M de la L, Macías-Zaragoza VM, Aguiñiga-Sánchez I. 2024. The Cancer-Protective Potential of Protocatechuic Acid: A Narrative Review. *Mol* 2024, Vol 29, Page 1439 29:1439.
- Cao Y, Chong Y, Shen H, Zhang M, Huang J, Zhu Y, Zhang Z. 2013. Combination of TNF- α and graphene oxide-loaded BEZ235 to enhance apoptosis of PIK3CA mutant colorectal cancer cells. *J Mater Chem B* 1:5602–5610.
- Chanioti S, Tzia C. 2018. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innov Food Sci Emerg Technol* 48:228–239.
- Chatterjee S, Ghosh R, Mandal NC. 2020. Inhibition of biofilm- and hyphal-development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential. *Microbiol Res* 232:126386.
- Chaves L, Universidad B, Sevilla DE, De Farmacia F. 2019. Papel de los polifenoles en la EII: nuevas propuestas relacionadas con el microbioma y con el succinato.
- Chen, Qi, Tingting Liu, Tuya Bai, Mengdi Zhang, Yuxia Hu JL and FC. 2022. Mechanism of *Synsepalum dulcificum* Daniell. Inhibiting Lung Adenocarcinoma. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2022.

- Chen C-C, Liu I-M, Cheng J-T. 2006. Improvement of insulin resistance by miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) in fructose-rich chow-fed rats. *Phyther Res* 20:987–992.
- Chen CY, Wang YD, Wang HM. 2010. Chemical constituents from the leaves of *Synsepalum dulcificum*. *Chem Nat Compd* 46:495–495.
- Chen YR, Chen CL, Zhang L, Green-Church KB, Zweier JL. 2005. Superoxide Generation from Mitochondrial NADH Dehydrogenase Induces Self-inactivation with Specific Protein Radical Formation. *J Biol Chem* 280:37339–37348.
- Chen Z, Dong Y, Huang X. 2022. Plant responses to UV-B radiation: signaling, acclimation and stress tolerance. *Stress Biol* 2.
- Choi JY, Lee JW, Jang H, Kim JG, Lee MK, Hong JT, Lee MS, Hwang BY. 2021. Quinic acid esters from *Erycibe obtusifolia* with antioxidant and tyrosinase inhibitory activities. *Nat Prod Res* 35:3026–3032.
- Choi YH, Verpoorte R. 2019. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Curr Opin Food Sci* 26:87–93.
- Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. 2011. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med* 208:251–260.
- Chukwuma CI, Mashele SS, Swain SS. 2021. Antidiabetic and Antioxidative Properties of Novel Zn(II)-cinnamic Acid Complex. *Med Chem* 17:913–925.
- Clevers H, Nusse R. 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149:1192–1205.
- Cvjetko Bubalo M, Ćurko N, Tomašević M, Kovačević Ganić K, Radojčić Redovniković I. 2016. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem* 200:159–166.
- D’Arena G, Simeon V, De Martino L, Statuto T, D’Auria F, Volpe S, Deaglio S, Maidecchi A, Mattoli L, Mercati V, Musto P, De Feo V. 2013. Regulatory T-

- Cell Modulation by Green Tea in Chronic Lymphocytic Leukemia. <http://dx.doi.org/101177/039463201302600111> 26:117–125.
- Danilova V, Hellekant G. 2006. Elucidating coding of taste qualities with the taste modifier miraculin in the common marmoset. *Brain Res Bull* 68:315–321.
- Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K. 2009. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:653–660.
- Demšar J, Erjavec A, Hočevár T, Milutinović M, Možina M, Toplak M, Umek L, Zbontar J, Zupan B. 2013. Orange: Data Mining Toolbox in Python Tomaz Curk Matija Polajnar Lañ Zagar. *J Mach Learn Res* 14:2349–2353.
- Dioso MKM, Satsatin DCA, Ching JA. 2016. Hypoglycemic effects of *Synsepalum dulcificum* (Schumacher & Thonn.) Daniell (Miracle Berry) fruit and leaf extracts on the blood glucose level of albino rats. *Der Pharm Lett* 8:104–108.
- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal* 22:296–302.
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355:1041–1047.
- Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Yissachar N, Stangl GI, Dawin E, Bader V, Haase S, Kaisler J, David C, Schneider R, Troisi R, Zent D, Hegelmaier T, Dokalis N, Gerstein S, Del Mare-Roumani S, Amidror S, Staszewski O, Poschmann G, Stühler K, Hirche F, Balogh A, Kempa S, Träger P, Zaiss MM, Holm JB, Massa MG, Nielsen HB, Faissner A, Lukas C, Gattermann SG, Scholz M, Przuntek H, Prinz M, Forslund SK, Winklhofer KF, Müller DN, Linker RA, Gold R, Haghikia A. 2020. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* 180:1067-1080.e16.

- Dutra NS, da Silva D'Ávila CM, da Silva TC, de Oliveira Mendes T, Livinalli IC, Bertoncelli ACZ, Saccol FK, Cadoná FC. 2024. Biological properties of caffeine, (+)-catechin, and theobromine: an in silico study. *3 Biotech* 14.
- Dützmann S, Schiborr C, Kocher A, Pilatus U, Hattingen E, Weissenberger J, Geßler F, Quick-Weller J, Franz K, Seifert V, Frank J, Senft C. 2016. Intratumoral Concentrations and Effects of Orally Administered Micellar Curcuminoids in Glioblastoma Patients. *Nutr Cancer* 68:943–948.
- Eckert F, Klamt A. 2002. Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach. *AIChE J* 48:369–385.
- EFSA. 2024. Novel food. *Nov food | EFSA*.
- Erickson JR, Joiner M ling A, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis C V., Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJL, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. 2008. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133:462–474.
- Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. 2016. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 44:973–988.
- European commission. 2024. Novel Food.
- European Commission. Authorisations . 2024.
- Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2017 157 15:385–396.
- Fandohan AB, Chadare FJ, Gouwakinnou GN, Tovissode CF, Bonou A, Djonlonkou SFB, Houndelo LFH, Sinsin CLB, Assogbadjo AE. 2017. Usages traditionnels et valeur économique de *Synsepalum dulcificum* au Sud-Bénin. *Bois Forets des Trop*:17–30.
- Fecher C, Trovò L, Müller SA, Snaidero N, Wettmarshausen J, Heink S, Ortiz O, Wagner I, Kühn R, Hartmann J, Karl RM, Konnerth A, Korn T, Wurst W, Merkler D, Lichtenthaler SF, Perocchi F, Misgeld T. 2019. Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. *Nat*

- Neurosci 2019 2210 22:1731–1742.
- Feng J, Li YP, Hu Y, Zhou Y, Zhang H, Wu F. 2022. Novel Quinic Acid Glycerates from *Tussilago farfara* Inhibit Polypeptide GalNAc-Transferase. *Chembiochem* 23.
- Folin O, Ciocalteu V. 1927. ON tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73:627–650.
- Foyer CH, Hanke G. 2022. ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *Plant J* 111:642.
- Gallardo-Fernández M, Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. 2023. Hydroxytyrosol and dopamine metabolites: Anti-aggregative effect and neuroprotective activity against α -synuclein-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 171.
- Ganguly U, Kaur U, Chakrabarti SS, Sharma P, Agrawal BK, Saso L, Chakrabarti S. 2021. Oxidative Stress, Neuroinflammation, and NADPH Oxidase: Implications in the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2021.
- García-Pérez P, Zhang L, Miras-Moreno B, Lozano-Milo E, Landin M, Lucini L, Gallego PP. 2021. The combination of untargeted metabolomics and machine learning predicts the biosynthesis of phenolic compounds in bryophyllum medicinal plants (Genus *kalanchoe*). *Plants* 10:2430.
- Ghasemi-Dehnoo M, Amini-Khoei H, Lorigooini Z, Ashrafi-Dehkordi K, Rafieian-Kopaei M. 2022. Coumaric acid ameliorates experimental colitis in rats through attenuation of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis. *Inflammopharmacology* 30:2359–2371.
- Ghorbani A. 2017. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed Pharmacother* 96:305–312.
- Gorin S, Wakeford C, Zhang G, Sukamtoh E, Matteliano CJ, Finch AE. 2018. Beneficial effects of an investigational wristband containing *Synsepalum dulcificum* (miracle fruit) seed oil on the performance of hand and finger motor

- skills in healthy subjects: A randomized controlled preliminary study. *Phyther Res* 32:321–332.
- Grey ADNJ. 2000. Mitochondria by Immo E. Scheffler. *Age (Omaha)* 23:255–256.
- Halliwell B, Zentella A, Gomez EO, Kershenobich D. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–S49.
- Han Y-C, Wu J-Y, Wang C-K. 2019. Modulatory effects of miracle fruit ethanolic extracts on glucose uptake through the insulin signaling pathway in C2C12 mouse myotubes cells. *Food Sci Nutr* 7:1035–1042.
- He X, Gao X, Guo Y, Xie W. 2024. Research Progress on Bioactive Factors against Skin Aging. *Int J Mol Sci* 25:3797.
- Hellekant G. 1976. ON THE GUSTATORY EFFECTS OF GYMNEMIC ACID AND MIRACULIN IN DOG, PIG AND RABBIT. *Chem Senses* 2:85–95.
- Henning SM, Wang P, Abgaryan N, Vicinanza R, de Oliveira DM, Zhang Y, Lee RP, Carpenter CL, Aronson WJ, Heber D. 2013. Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. *Mol Nutr Food Res* 57:483–493.
- Hensen JP, Hoening F, Weilack I, Damm S, Weber F. 2022. Influence of Grape Cell Wall Polysaccharides on the Extraction of Polyphenols during Fermentation in Microvinifications. *J Agric Food Chem* 70:9117–9131.
- Hillion S, Arleevskaya MI, Blanco P, Bordron A, Brooks WH, Cesbron JY, Kaveri S, Vivier E, Renaudineau Y. 2020. The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clin Rev Allergy Immunol* 58:151–154.
- Hollman PCH, Geelen A, Kromhout D. 2010. Dietary Flavonol Intake May Lower Stroke Risk in Men and Women,. *J Nutr* 140:600–604.
- Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, Ryder JJ, Hall WL, Cassidy A. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 88:38–50.
- Horowitz RM, Gentili B. 1969. Taste and Structure in Phenolic Glycosides. *J Agric*

Food Chem 17:696–700.

Huang W, Chung HY, Xuan W, Wang G, Li Y. 2020. The cholesterol-lowering activity of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*). *J Food Biochem* 44:e13185.

Ibrahim AA, El-Housseiny GS, Aboshanab KM, Yassien MA, Hassouna NA. 2019. Paromomycin production from *Streptomyces rimosus* NRRL 2455: statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant pathogens. *BMC Microbiol* 19.

Information Facility Global Biodiversity. 2023. Restoring degraded land of Ewe-Adakplame Relic Forest, Benin | Botanic Gardens Conservation International.

Institute of Biomedical Imaging N. 2020. Computational Modeling.

Irato P, Santovito G. 2021. Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants* 10.

Iza fadhila salma, Hayati elok kamilah rafi, Mohamad, akhmad sabarudin. 2023. EXTRACTION, EFFECT OF ETHANOL-WATER CONCENTRATION AS Indica, SOLVENT ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Acalypha*. *al Kim J Ilmu Kim dan Terap* 10, No. 2:133–142.

Jaffe R, Mani J. 2014. Polyphenolics Evoke Healing Responses: Clinical Evidence and Role of Predictive Biomarkers. *Polyphenols Hum Heal Dis* 1:695–705.

Jiang K, Yan X, Yu J, Xiao Z, Wu H, Zhao M, Yue Y, Zhou X, Xiao J, Lin F. 2020. Design, synthesis, and biological evaluation of 3-amino-2-oxazolidinone derivatives as potent quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Med Chem* 194:112252.

Jiang Y, Pei J, Zheng Y, Miao Y jing, Duan B zhong, Huang L fang. 2022. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. *Chin J Integr Med* 28:661–671.

Jiao L, Taylor PR, Weinstein SJ, Graubard BI, Virtamo J, Albanes D, Stolzenberg-Solomon RZ. 2011. Advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products, and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:1430–1438.

- Jichang Seong, Glenn G Oyong ECC. 2018. *Synsepalum dulcificum* extracts exhibit cytotoxic activity on human colorectal cancer cells and upregulate c-fos and c-jun early apoptotic gene expression. *Asian Pac J Trop Biomed* 8:173–178.
- Jiménez-Moreno N, Volpe F, Moler JA, Esparza I, Ancín-Azpilicueta C. 2019. Impact of Extraction Conditions on the Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Grape Stem Extracts. *Antioxidants* 8.
- Joglekar A V., Leonard MT, Jeppson JD, Swift M, Li G, Wong S, Peng S, Zaretsky JM, Heath JR, Ribas A, Bethune MT, Baltimore D. 2019. T cell antigen discovery via signaling and antigen-presenting bifunctional receptors. *Nat Methods* 16:191–198.
- Johra FT, Hossain S, Jain P, Bristy AT, Emran T, Ahmed R, Sharker SM, Bepari AK, Reza HM. 2023. Amelioration of CCl₄-induced oxidative stress and hepatotoxicity by *Ganoderma lucidum* in long evans rats. *Sci Rep* 13.
- Junior SD, Amorim CJGD, Durval JDPD, Costa IJB, Lamare AD, De Medeiros M, Galdino Da Silva Junior CJ, Didier J, De Amorim P, José I, Durval B, Fernanda De Santana Costa A, Sarubbo LA. 2022. Oily Wastewater Treatment: Methods, Challenges, and Trends. *Process* 2022, Vol 10, Page 743 10:743.
- Kakkar S, Bais S. 2014. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacol* 2014:1–9.
- Kaneko H, Anzai T, Morisawa M, Kohno T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Shimoda M, Sasaki A, Maekawa Y, Yoshimura K, Aoki H, Tsubota K, Yoshikawa T, Okada Y, Ogawa S, Fukuda K. 2011. Resveratrol prevents the development of abdominal aortic aneurysm through attenuation of inflammation, oxidative stress, and neovascularization. *Atherosclerosis* 217:350–357.
- Kaufmann B, Christen P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal* 13:105–113.

- Kavanagh KT, Hafer LJ, Kim DW, Mann KK, Sherr DH, Rogers AE, Sonenshein GE. 2001. Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *J Cell Biochem* 82:387–398.
- Kumar S, Sandhir R, Ojha S. 2014. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Res Notes* 7:1–9.
- Kusumiyati K, Asikin Y. 2023. Machine learning-based prediction of total phenolic and flavonoid in horticultural products. *Open Agric* 8.
- Labat J-B (1663-1738). *A du texte*, Des Marchais R (16. .-1728?). *A du texte*. 1730. Voyage du chevalier Des Marchais en Guinée, isles voisines, et a Cayenne : fait en 1725, 1726 et 1727.... Tome 2 / par le R.P. Labat,...
- Laily N, Kusumaningtyas RW, Sukarti I, Rini MRDK. 2015. The Potency of Guava *Psidium Guajava* (L.) Leaves as a Functional Immunostimulatory Ingredient. *Procedia Chem* 14:301–307.
- Lam LHT, Le NHQK, Van Tuan L, Ban HT, Hung TNK, Nguyen NTK, Dang LH, Le NHQK. 2020. Machine Learning Model for Identifying Antioxidant Proteins Using Features Calculated from Primary Sequences. *Biol* 2020, Vol 9, Page 325 9:325.
- Lei G, Liu S, Yang X, He C. 2021. TRIM29 Reverses Oxaliplatin Resistance of P53 Mutant Colon Cancer Cell. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2021.
- Leibovitz BE, Siegel B V. 1980. Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J Gerontol* 35:45–56.
- Leng KY, Suyin G. 2019. Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) as a Greener Alternative for the Extraction of Hydrophilic (Polar) and Lipophilic (Non-Polar) Phytonutrients. *Key Eng Mater* 797:20–28.
- Li D, Rui Y xin, Guo S duo, Luan F, Liu R, Zeng N. 2021. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sci* 284.
- Li FJ, Ji HF, Shen L. 2012. A meta-analysis of tea drinking and risk of Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal* 2012.

- Li L, Cao L, Xiang X, Wu X, Ma L, Chen F, Cao S, Cheng C, Deng D, Qiu L, Li L, Xiang X, Wu X, Ma L, Chen F, Cao SJ, Cheng C, Qiu L, Cao LJ, Deng DW. 2022. ROS-Catalytic Transition-Metal-Based Enzymatic Nanoagents for Tumor and Bacterial Eradication. *Adv Funct Mater* 32:2107530.
- Lim, Lim TK, Lim, Lim TK, Lim, Lim TK. 2013. *Synsepalum dulcificum*. *Edible Med Non-Medicinal Plants* 6:146–150.
- Lim SA, Su W, Chapman NM, Chi H. 2022. Lipid metabolism in T cell signaling and function. *Nat Chem Biol* 18:470–481.
- Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ. 2007. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *Int J cancer* 120:2306–2316.
- Liu G, Zhang B fang, Hu Q, Liu X pei, Chen J. 2020. Syringic acid mitigates myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 531:242–249.
- Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF. 2018. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* 81:679–690.
- Liu Y, Garzon J, Friesen JB, Zhang Y, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF. 2016. Countercurrent assisted quantitative recovery of metabolites from plant-associated natural deep eutectic solvents. *Fitoterapia* 112:30–37.
- Liu YG, Li B, Fu Q, Zhang XM, Ma FY, Hu Y. 2021. Miracle Fruit Leaf Extract: Antioxidant Activity Evaluation, Constituent Identification, and Medical Applications. *Anal Lett* 54:2211–2226.
- Loh KE, Chin YS, Safinar Ismail I, Tan HY. 2022. Rapid characterisation of xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Using metabolomics approach. *Phytochem Anal* 33:12–22.
- López-Plaza B, Álvarez-Mercado AI, Arcos-Castellanos L, Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Brandimonte-Hernández M, Feliú-Batlle J, Hummel T, Gil Á, Palma-Milla S. 2024. Efficacy and Safety of Habitual Consumption of a Food

Supplement Containing Miraculin in Malnourished Cancer Patients: The CLINMIR Pilot Study. *Nutrients* 16:1905.

López-Plaza B, Gil Á, Menéndez-Rey A, Bensadon-Naeder L, Hummel T, Feliú-Batlle J, Palma-Milla S. 2023. Effect of Regular Consumption of a Miraculin-Based Food Supplement on Taste Perception and Nutritional Status in Malnourished Cancer Patients: A Triple-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial-CLINMIR Pilot Protocol. *Nutrients* 15:4639.

Luo H, Tang L, Tang M, Billam M, Huang T, Yu J, Wei Z, Liang Y, Wang K, Zhang ZQ, Zhang L, Wang JS. 2006. Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis* 27:262–268.

Ma FY, Zhang XM, Li Y, Zhang M, Tu XH, Du LQ. 2022. Identification of phenolics from miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) leaf extract and its antiangiogenesis and anticancer activities. *Front Nutr* 9.

Magrone T, Spagnoletta A, Salvatore R, Magrone M, Dentamaro F, Russo MA, Difonzo G, Summo C, Caponio F, Jirillo E. 2017. Olive Leaf Extracts Act as Modulators of the Human Immune Response. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets* 18:85–93.

Malek TR. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453–479.

Manach C, Donovan JL. 2004. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 38:771–785.

Marangoni F, Poli A. 2010. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res* 61:193–199.

McCormick F. 2015. KRAS as a Therapeutic Target. *Clin Cancer Res* 21:1797–1801.

Menéndez-Rey A, González-Martos R, Ye P, Quiroz-Troncoso J, Alegría-Aravena N, Sánchez-Díez M, Maestu-Unturbe C, Bensadon-Naeder L, Ramírez-Castillejo C. 2021. Quantification of lectins in *Synsepalum dulcificum* and

- comparison with reference foods. *Food Chem* 352:129341.
- Menéndez Rey A. 2021. Actividad biológica e inmunogénica de *Synsepalum dulcificum* para el desarrollo de alimentos funcionales. Tesis Dr Telecomunicación.
- Mengesha AE, Wydra RJ, Hilt JZ, Bummer PM. 2013. Binary blend of glyceryl monooleate and glyceryl monostearate for magnetically induced thermo-responsive local drug delivery system. *Pharm Res* 30:3214–3224.
- Mills KHG. 2023. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol* 23:38–54.
- Mishra SK, Ishfaq PM, Tripathi S, Gupta N. 2022. Fruits as Boosters of the Immune System. *Plants Phytomolecules Immunomodulation Recent Trends Adv*:391–411.
- Monroy YM, Rodrigues RAF, Sartoratto A, Cabral FA. 2016. Influence of ethanol, water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (*Zea mays* L.). *J Supercrit Fluids* 118:11–18.
- Moon HJ, Jeya M, Kim IW, Lee JK. 2010. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1017–1025.
- Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. 2020. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *Int J Mol Sci* 21.
- Nacional P, Oficial C, Alimentaria C. 2024. Programa 12 Aditivos y otros ingredientes tecnológicos en alimentos.
- Niu L, Li W, Chen X, Su X, Dong J, Liao Q, Zhou X, Shi S, Sun R. 2023. 1-Monopalmitin promotes lung cancer cells apoptosis through PI3K/Akt pathway in vitro. *Environ Toxicol* 38:2621–2631.
- Nowak D, Gośliński M, Przygoński K, Wojtowicz · Elżbieta. 2018. The antioxidant properties of exotic fruit juices from acai, maqui berry and noni berries. 244:1897–1905.
- Obafemi TO, Akinmoladun AC, Olaleye MT, Agboade SO, Onasanya AA. 2017.

- Antidiabetic potential of methanolic and flavonoid-rich leaf extracts of *Synsepalum dulcificum* in type 2 diabetic rats. *J Ayurveda Integr Med* 8:238–246.
- Obafemi TO, Olaleye MT, Akinmoladun AC. 2019. Antidiabetic property of miracle fruit plant (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) leaf extracts in fructose-fed streptozotocin-injected rats via anti-inflammatory activity and inhibition of carbohydrate metabolizing enzymes. *J Ethnopharmacol* 244.
- Olsen TH, Yesiltas B, Marin FI, Pertseva M, García-Moreno PJ, Gregersen S, Overgaard MT, Jacobsen C, Lund O, Hansen EB, Marcatili P. 2020. AnOxPePred: using deep learning for the prediction of antioxidative properties of peptides. *Sci Reports* 2020 10:1–10.
- Paradiso VM, Clemente A, Summo C, Pasqualone A, Caponio F. 2016. Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. *Food Chem* 212:43–47.
- Parlamento europeo y el consejo de la unión europea. 2015. REGLAMENTO.
- Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. 2016. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric* 96:2952–2962.
- Peres DDA, Sarruf FD, de Oliveira CA, Velasco MVR, Baby AR. 2018. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. *J Photochem Photobiol B* 185:46–49.
- Pérez-Pérez, G. Ettiene MM, A. Casassa-Padron⁴, N. Silva, J. Raga, C. González¹ LS, y D. Medina. 2014. Determination of total phenols and flavonoids in guava leaves (*Psidium guajava* L.). *RevFacAgron* 31:60–77.
- Peroković VP, Car Ž, Usenik A, Opačak-Bernardi T, Jurić A, Tomić S. 2020. Adamantyl pyran-4-one derivatives and their in vitro antiproliferative activity. *Mol Divers* 24:253–263.

- Plaza-Oliver M, Beloqui A, Santander-Ortega MJ, Castro-Vázquez L, Rodríguez-Robledo V, Arroyo-Jiménez MM, Préat V, Lozano M V. 2020. Ascorbyl-dipalmitate-stabilised nanoemulsions as a potential localised treatment of inflammatory bowel diseases. *Int J Pharm* 586.
- Pollak N, Lindner A, Imig D, Kuritz K, Fritze JS, Decker L, Heinrich I, Stadager J, Eisler S, Stöhr D, Allgöwer F, Scheurich P, Rehm M. 2021. Cell cycle progression and transmitotic apoptosis resistance promote escape from extrinsic apoptosis. *J Cell Sci* 134.
- Qi W, Qi W, Xiong D, Long M. 2022. Quercetin: Its Antioxidant Mechanism, Antibacterial Properties and Potential Application in Prevention and Control of Toxipathy. *Molecules* 27.
- Rai N, Madni A, Faisal A, Jamshaid T, Khan MI, Khan MM, Parveen F. 2021. Glyceryl Monostearate based Solid Lipid Nanoparticles for Controlled Delivery of Docetaxel. *Curr Drug Deliv* 18:1368–1376.
- Rappoport Z ed. 2003. *The Chemistry of Phenols*.
- Razak MA, Begum PS, Viswanath B, Rajagopal S. 2017. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxid Med Cell Longev* 2017.
- Razboršek MI, Ivanović M, Krajnc P, Kolar M. 2020. Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Extracting Phenolic Compounds from Chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Mol* 2020, Vol 25, Page 1619 25:1619.
- Richard-Bollans A, Aitken C, Antonelli A, Bitencourt C, Goyder D, Lucas E, Ondo I, Pérez-Escobar OA, Pironon S, Richardson JE, Russell D, Silvestro D, Wright CW, Howes MJR. 2023. Machine learning enhances prediction of plants as potential sources of antimalarials. *Front Plant Sci* 14.
- Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, Cardozo-Saldaña G, Diaz-Diaz E, El-Hafidi M. 2014. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin Sci* 126:19–29.

- Sadasivam N, Kim YJ, Radhakrishnan K, Kim DK. 2022. Oxidative Stress, Genomic Integrity, and Liver Diseases. *Molecules* 27.
- Sadhana HM, Joghee S, Hamsalakshmi. 2020. *Synsepalum dulcificum*: A review. *Int J Res Pharm Sci* 11:4208–4213.
- Saha S, Panieri E, Suzen S, Saso L. 2020. The Interaction of Flavonols with Membrane Components: Potential Effect on Antioxidant Activity. *J Membr Biol* 253:57–71.
- Salehi F, Behboudi H, Kavooosi G, Ardestani SK. 2018. Oxidative DNA damage induced by ROS-modulating agents with the ability to target DNA: A comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. *Sci Rep* 8.
- Salomón R, Firmino JP, Reyes-López FE, Andree KB, González-Silvera D, Esteban MA, Tort L, Quintela JC, Pinilla-Rosas JM, Vallejos-Vidal E, Gisbert E. 2020. The growth promoting and immunomodulatory effects of a medicinal plant leaf extract obtained from *Salvia officinalis* and *Lippia citriodora* in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 524:735291.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81.
- Sco M, Ab O, Ts O, Ts A. 2015. An Ethnomedical and Ethnobotanical survey of Plants Herbal Therapy used for Obesity, Asthma, Diabetes and Fertility by the Badagry people of Lagos State, Nigeria. ~ 1 ~ *J Med Plants Stud* 3.
- Shafabakhsh R, Pourhanifeh MH, Mirzaei HR, Sahebkar A, Asemi Z, Mirzaei H. 2019. Targeting regulatory T cells by curcumin: A potential for cancer immunotherapy. *Pharmacol Res* 147.
- Shalaby S, Horwitz BA. 2015. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal–plant interactions. *Curr Genet* 61:347–357.
- Sharma N, Tan MA, An SSA. 2021. Phytosterols: Potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* 22.
- Shi Y-C, Lin K-S, Jhai Y-F, Lee B-H, Han Y, Cui Z, Hsu W-H, Wu S-C. 2016.

- Miracle Fruit (*Synsepalum dulcificum*) Exhibits as a Novel Anti-Hyperuricaemia Agent. *Molecules* 21:140.
- Silva H, Lopes NMF. 2020. Cardiovascular Effects of Caffeic Acid and Its Derivatives: A Comprehensive Review. *Front Physiol* 11.
- Sinsuebpol C, Burapapadh K, Chowjaroen V, Changsan N. 2023. The radical scavenging activity of vanillin and its impact on the healing properties of wounds. *J Adv Pharm Technol Res* 14:99–104.
- Snyder LR. 1978. Classification of the solvent properties of common liquids. *J Chromatogr Sci* 16:223–234.
- Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. 2002. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105:1429–1435.
- springer US. 1992. *Plant Polyphenols*. Springer US.
- Sticher O. 2008. Natural product isolation. *Nat Prod Rep* 25:517–554.
- Sun Y, Huang T, Hammarstrom L, Zhao Y. 2020. The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications. *Annu Rev Anim Biosci* 8:145–169.
- Taghadomi-Saberi S, Garcia SM, Masoumi AA, Sadeghi M, Marco S. 2018. Classification of Bitter Orange Essential Oils According to Fruit Ripening Stage by Untargeted Chemical Profiling and Machine Learning. *Sensors (Basel)* 18.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.
- Tangney CC, Rasmussen HE. 2013. Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep* 15:324.
- Tchokponhoué DA, Achigan-Dako EG, N'Danikou S, Houdégbé AC, Aboègnonhou Agossou CO, Assogba-Komlan F, Vodouhè RS. 2018. Regeneration ability and seedling growth in the miracle plant *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell. *Fruits* 73:13–21.

- Tchokponhoué DA, Achigan-Dako EG, N'Danikou S, Nyadanu D, Kahane R, Odindo AO, Sibiya J. 2021. Comparative analysis of management practices and end-users' desired breeding traits in the miracle plant [*Synsepalum dulcificum* (Schumach & Thonn.) Daniell] across ecological zones and sociolinguistic groups in West Africa. *J Ethnobiol Ethnomed* 17:1–20.
- Tchokponhoué DA, Legba EC, N'Danikou S, Nyadanu D, Oselebe HO, Achigan-Dako EG. 2023. Developing improvement strategies for management of the Sisrè berry plant [*Synsepalum dulcificum* (Schumach & Thonn.) Daniell] based on end-users' preferences in Southern Nigeria. *Front Sustain Food Syst* 7:1252036.
- Tchokponhoué DA, N'Danikou S, Hale I, Van Deynze A, Achigan-Dako EG. 2017. Early fruiting in *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell juveniles induced by water and inorganic nutrient management. *F1000Research* 6.
- Tchokponhoué DA, N'Danikou S, Houéto JS, Achigan-Dako EG. 2019. Shade and nutrient-mediated phenotypic plasticity in the miracle plant *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell. *Sci Rep* 9.
- Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, Parmigiani G, Vogelstein B. 2015. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:118–123.
- Trusolino L, Bertotti A. 2012. Compensatory Pathways in Oncogenic Kinase Signaling and Resistance to Targeted Therapies: Six Degrees of Separation. *Cancer Discov* 2:876–880.
- Tsuji T, Sapinoso LM, Tran T, Gaffney B, Wong L, Sankar S, Raymon HK, Mortensen DS, Xu S. 2017. CC-115, a dual inhibitor of mTOR kinase and DNA-PK, blocks DNA damage repair pathways and selectively inhibits ATM-deficient cell growth in vitro. *Oncotarget* 8:74688–74702.
- Turck D, Castenmiller J, Henauw S De, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Siani A, Thies F, Tsabouri S, Vinceti M, Cubadda F, Frenzel T, Heinonen M, Marchelli R,

- Neuhäuser-Berthold M, Poulsen M, Maradona MP, Schlatter JR, Loveren H van, Matijević L, Knutsen HK. 2021. Safety of dried fruits of *Synsepalum dulcificum* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J* 19:6600.
- USDA Agricultural Research Service. 2022. FoodData Central.
- Vazhappilly CG, Hodeify R, Siddiqui SS, Laham AJ, Menon V, El-Awady R, Matar R, Merheb M, Marton J, Al Zouabi HAK, Radhakrishnan R. 2021. Natural compound catechol induces DNA damage, apoptosis, and G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Phytother Res* 35:2185–2199.
- Vessal M, Hemmati M, Vasei M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135C:357–364.
- Wagner S, Gómez de Cedrón M, Navarro del Hierro J, Martín-Hernández D, Siles M de las N, Santoyo S, Jaime L, Martín D, Fornari T, Ramírez de Molina A. 2023. Biological Activities of Miracle Berry Supercritical Extracts as Metabolic Regulators in Chronic Diseases. *Int J Mol Sci* 24.
- Wang G, Cui Q, Yin LJ, Zheng X, Gao MZ, Meng Y, Wang W. 2019a. Efficient extraction of flavonoids from *Flos Sophorae Immaturus* by tailored and sustainable deep eutectic solvent as green extraction media. *J Pharm Biomed Anal* 170.
- Wang HM, Chou YT, Hong ZL, Chen HA, Chang YC, Yang WL, Chang HC, Mai CT, Chen CY. 2011. Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties. *J Taiwan Inst Chem Eng* 42:204–211.
- Wang L, Lin N, Li Y. 2019b. The PI3K/AKT signaling pathway regulates ABCG2 expression and confers resistance to chemotherapy in human multiple myeloma. *Oncol Rep* 41:1678–1690.
- Wang P, Aronson WJ, Huang M, Zhang Y, Lee RP, Heber D, Henning SM. 2010.

- Green tea polyphenols and metabolites in prostatectomy tissue: implications for cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 3:985–993.
- Waszkowiak K, Gliszczyńska-Świgło A. 2016. Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. *Eur Food Res Technol* 242:777–786.
- Weil MJ, Zhang Y, Nair MG. 2004. Colon cancer proliferating desulfosinigrin in wasabi (*Wasabia japonica*). *Nutr Cancer* 48:207–213.
- Wilken MK, Satiroff BA. 2012. Improving Food Taste With Miracle Fruit Supplement E173 Pilot Study of “Miracle Fruit” to Improve Food Palatability for Patients Receiving Chemotherapy. *Clin J Oncol Nurs* 16.
- Windvogel S. 2020. Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybush (*Cyclopia* spp.): From Bush Teas to Potential Therapy for Cardiovascular Disease . *Nutraceuticals - Past, Present Futur*.
- Wong RHX, Raederstorff D, Howe PRC. 2016. Acute Resveratrol Consumption Improves Neurovascular Coupling Capacity in Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* 8.
- World Health Organization. 2023. Influenza (Seasonal).
- Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. 2001. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J Am Chem Soc* 123:1173–1183.
- Wynn TA. 2003. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21:425–456.
- Xie J, Chen X, Tan Y, Li W, Yin C, Zhong T, Su D, Sun J, Tian H, Huang W. 2024. Anti-Hyperlipidemic Components of the Leaves of *Synsepalum dulcificum* (Miracle Fruit). *Plant Foods Hum Nutr*:1–9.
- Xingway C, Abdullah TL, Taheri S, Abdulla NAP, Hassan SA. 2016. Flower Ontogenesis and Fruit Development of *Synsepalum dulcificum*. *HortScience* 51:697–702.
- Xiong S, Li R, Ye S, Ni P, Shan J, Yuan T, Liang J, Fan Y, Zhang X. 2022. Vanillin

- enhances the antibacterial and antioxidant properties of polyvinyl alcohol-chitosan hydrogel dressings. *Int J Biol Macromol* 220:109–116.
- Yamauchi M, Kitamura Y, Nagano H, Kawatsu J, Gotoh H. 2024. DPPH Measurements and Structure—Activity Relationship Studies on the Antioxidant Capacity of Phenols. *Antioxidants* 13:309.
- Yañez O, Osorio MI, Osorio E, Tiznado W, Ruíz L, García C, Nagles O, Simirgiotis MJ, Castañeta G, Areche C, García-Beltrán O. 2023. Antioxidant activity and enzymatic of lichen substances: A study based on cyclic voltammetry and theoretical. *Chem Biol Interact* 372.
- Yong DOC, Saker SR, Chellappan DK, Madheswaran T, Panneerselvam J, Choudhury H, Pandey M, Chan YL, Collet T, Gupta G, Oliver BG, Wark P, Hansbro N, Hsu A, Hansbro PM, Dua K, Zeeshan F. 2020. Molecular and Immunological Mechanisms Underlying the Various Pharmacological Properties of the Potent Bioflavonoid, Rutin. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 20:1590–1596.
- York-Duran MJ, Godoy-Gallardo M, Jansman MMT, Hosta-Rigau L. 2019. A dual-component carrier with both non-enzymatic and enzymatic antioxidant activity towards ROS depletion. *Biomater Sci* 7:4813–4826.
- Yu G, Luo H, Zhang N, Wang Y, Li Y, Huang H, Liu Y, Hu Y, Liu H, Zhang J, Tang Y, Huang Y. 2019. Loss of p53 Sensitizes Cells to Palmitic Acid-Induced Apoptosis by Reactive Oxygen Species Accumulation. *Int J Mol Sci* 20.
- Yu YX, Pan WC, Cheng YF. 2017. Silencing of advanced glycosylation and glycosylation and product-specific receptor (RAGE) inhibits the metastasis and growth of non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 9:2760.
- Yung-Chi C, Prusoff WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–3108.
- Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H. 2018. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol* 31:332–336.

- Zeqli H, Metouekel A, Zouirech O, Maliki I, El Moussaoui A, Lfitat A, Bousseraf FZ, Almaary KS, Nafidi HA, Khallouki F, Bourhia M, Taleb M, Abdellaoui A. 2024. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory, Hemagglutinin and Hemolytic Activities of Chemically Characterized Extracts from *Origanum grosii* (L.) and *Thymus pallidus* (L.). *Plants* 2024, Vol 13, Page 385 13:385.
- Zhang L, Shay JW. 2017. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 109.
- Zhang S, Gai Z, Gui T, Chen J, Chen Q, Li Y. 2021. Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde: Old Wine in a New Bottle. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021.
- Zou JY, Su CH, Luo HH, Lei YY, Zeng B, Zhu HS, Chen ZG. 2018. Curcumin converts Foxp3+ regulatory T cells to T helper 1 cells in patients with lung cancer. *J Cell Biochem* 119:1420–1428.
- Zou R, Zhou K, Stephanopoulos G, Too HP. 2013. Combinatorial engineering of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway using cross-lapping in vitro assembly (CLIVA) method. *PLoS One* 8:1–12.

9. Anexos

Anexo 1 | Propiedades nutricionales de diferentes tipos de frutas

Propiedad nutricional mg o g / 100 g peso fresco	Frutas																								
	Acai	Acerola	Aguacate	Arandano	Banana	Ciruela	Dátil	Frambuesa	Fresa	Guaraná	Kiwi	Limón	Lucuma	Manzana	Maqui	Naranja	Papaya	Piña	Pitahaya	Pomelo	Uva	Caqui	Feijoa	Uchuva	Tuna
Energía total(Kcal)	130	32	233	64	98	48,1	89,45	57	36	335	51,8	27,66	96	54,08	150	52	35,01	60	60	36,63	67,1	74,22	41,58	53	50
Proteína (g)	2	0,4	1,88	0,63	1,06	0,63	1,88	1,31	0,81	13,5	1	0,69	2,2	0,31	0,74	0,87	0,5	0,54	1,1	0,63	0,72	0,63	0,71	2,2	0,7
Hidratos carbono (g)	5	8,3	0,4	14,6	23	10,2	65,1	12,9	7,96	50,5	9,12	3,16	24,5	11,4	20,6	11,8	7,1	13,12	11	7,41	15,5	16	15,21	11,2	7,4
Azúcar (g)	2	0,4	0,7	0,36	15,8	9,9	66,5	2,6	4,86	1,1	8,9	2,5	13	13,8	14,6	8,5	5,9	9,9	9	6,2	16,3	12,5	8,2	9,9	8,7
Fibra (g)	5,3	1,1	6,33	2,4	2,6	1,5	6,7	6,5	2	3,8	3	2,8	2,3	2,4	5,2	2,4	2	0,9	3	1	0,9	3,6	2,9	4,9	0,4
Fibra soluble (g)	1,27	0,1	1,4	1,7	1	0,7	2,8	2,2	0,6	3,45	2	2,8	0,6	0,5	2	1,9	0,5	0,33	1	0,6	0,6	2,6	1,6	2,5	1,3
Fibra insoluble (g)	3,8	1	4,9	0,7	1,6	0,8	3,9	4,3	1,4	0,35	1	0	1,7	1,9	3,2	0,5	1,5	0,57	2	0,4	0,3	1	1,3	2,4	2,3
Grasa total (g)	49	0,3	23,5	0,6	0,27	0,17	0,45	0,3	0,4	2,3	0,8	0,3	0,5	0,36	0,62	0,2	0,09	0,12	0,4	0,15	0,16	0,3	0,43	0,9	0,6
Ácidos Grasos Saturados (g)	0,88	0,1	1,9	1	0,12	0,02	0,15	0,01	0,03	0,6	0,1	0,04	0,2	0,06	0,19	0,03	0,03	0,009	0,1	0,04	0,05	0,05	0,12	0,2	2,1
Ácidos Grasos Monoinsaturado (g)	0	0,1	15,48	1	0,04	0,05	0,15	0,03	0,06	0,8	0,1	0,01	0,1	0,15	0,006	0,05	0,03	0,013	0,1	0,03	0,01	0,09	0,058	0,1	2,5
Ácidos Grasos Poliinsaturado (g)	4,39	0,1	1,87	1	0	0,08	0,03	0,2	0,24	0,6	0,4	0,09	0,1	0,11	0,21	0	0,02	0,04	0,2	0,06	0,05	0,06	0,26	0,1	5,2
Agua (g)	85	91	67,9	84,2	75,3	87,4	23,9	85,6	90,8	98,35	87	91,2	73	85,9	56	87,7	90,4	86	87	90,2	83,2	80,5	88	86	90
Calcio (Ca) (mg)	35	12	12	12	5	8,3	63	16	17	16	34,11	11	16	5,5	320	43	21	13	45,7	23	10	8	185	2,6	10
Hierro(Fe) (mg)	0,63	0,2	0,49	0,34	0,4	0,26	1,9	0,45	0,26	5,4	0,37	0,45	2,5	0,56	30,5	0,49	0,42	0,05	0,87	0,17	0,3	0,37	2,5	5	0,02
Magnesio(Mg) (mg)	60	18	30	2,4	28	7,9	50	19,2	12,5	77	14,93	28	42	5,6	30,9	10,7	11	12	23	9,6	7,1	8	121	20	15,2
Zinc (Zn) (mg)	1	0,2	0,4	0,09	0,16	0,09	0,3	0,22	0,11	3,3	0,16	0,11	0,4	0,13	0,87	0,15	0,16	0,1	0,34	0,07	0,03	0,04	0,9	1,5	0,05
Selenio(Se) (ug)	1	0,6	0,4	0,1	2,5	0,59	3	1,3	1,3	0	0,6	1	29	1,4	Des.	0	0,6	0,1	0,6	1	0,1	0,6	0,5	0,7	0,8
Sodio (Na)(mg)	26	7	4,7	1	4	1,7	8	2,5	2	6	4	1,9	9	1,2	4,29	9	3	2,5	4,5	1,1	3	4	18,87	2,7	0,25
Potasio(K)(mg)	105	1677	487	78	370	177	650	156	161	1042	290	170	320	120	1312	165	200	109	156	148	218	178	2,55	404	18,7
Fósforo (P) (mg)	30	11	0	13	22	2,1	0	27	23	65	0	10	31	9,1	44	23	0	8	22,5	24	22	0	0	55	12
Nitrogeno (mg)	0,348	0,1088	0,3	0,11	0,12	0,1	0,3	0,16	0,1	2,6	0,16	0,11	0,352	16	2,24	0,14	0,08	0,086	0,17	0,1	0,14	0,1	0,11	0,35	0,11
Manganeso (Mn) (mg)	0,6	0,8	0,8	0,423	0,7	0,4	0,7	0,49	0,7	0,6	0,2	0,2	1,2	0,2	0,3	0,029	0,2	0,866	0,2	0,2	0,3	0,4	0,084	0,5	0,0078
Cobre(Cu) (mg)	0,8	0,12	0,3	0,046	0,1	0,15	0,85	0,053	0,035	0,4	0,17	0,08	2,5	0,07	0,06	0,064	0,2	0,095	0,03	0,05	0,061	0,15	0,11	1	0,002
Vitamina B1 Tiamina [mg]	0,25	0,0009	0,008	0,02	0,056	0,07	0,06	0,02	0,03	0,13	0,02	0,05	0,007	0,04	0,068	0,068	0,03	0,064	0,04	0,05	0,04	0,02	1	0,13	0,01
Vitamina B2 Riboflavina [mg]	0,03	0,043	0,15	0,02	0,1	0,04	0,08	0,05	0,05	0,003	0,04	0,02	0,15	0,03	0,051	0,04	0,04	0,032	0,05	0,02	0,02	0,03	1	0,15	0,02
Eq. miscina [mg]	0,8	0,4	1,42	0,09	0,66	1,31	2,32	0,78	0,79	1,4	0,6	0,27	1,5	0,13	0,425	0,48	0,41	0,228	0,43	0,37	0,37	0,28	0,053	0,03	0,03
Vitamina B6 Piridoxina [mg]	0,1	0,0009	0,36	0,06	0,2	0,05	0,16	0,06	0,06	0,09	0,12	0,06	0,35	0,06	0,079	0,06	0,03	0,11	0,045	0,03	0,16	0,1	0,037	Des.	0,216
Acido Fólico [ug]	5	14	30	10	14	2	21	30	61,57	16	26,83	6,3	9	5,8	24	25	38	18	3	14	27	7	14	0,1	78,2
Vitamina C (Acido ascórbico) [mg]	0	1677,6	6	8,1	12,3	5,4	3	23	59,6	0,4	43,14	51	6,3	12,4	59	59,1	80	58	20,5	36	3	16	273	46	47,8
Carotenoides (Eq. 8 carotenos) [ug]	240	40	53,5	34,2	8	371,5	34	22,5	18	108	37,25	3,4	2,3	14,95	154	39,41	165	42,8	Des.	9,2	60	160	733	335	126
Vitamina A Eq. Retinol [ug]	0,6	80	12	5,7	1	64,67	5,67	3,75	3	0,3	6,22	0,57	292	3	Des.	33,6	152,5	3	0,003	1,8	10	267	122,2	1460	3
Biotina (ug)	6	8	6	3,7	0,004	0,2	6	3,43	3,7	0,2	0,6	0,1	Des.	0,004	17	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	3,7	2	1	Des.	0,3
Ácido graso Oleico C18:1 [g]	10	0,079	15,1	0,006	0,3	0,12	0,76	0,03	0,06	6	0,1	0,01	0,694	0,01	20,24	0,05	0,01	0,05	0,1	0,03	0,03	0,06	0,04	1,4	7,4
Ácido graso Linoleico C18:2 [g]	6	0,045	1,66	0	0,04	0,05	0,03	0,13	0,13	1,6	0,34	0,06	0,627	0,09	0,08	0,05	0	0,2	0,37	0,04	0,04	0,06	0,15	10	4,8
Ácido graso Linolénico C18:3 [g]	0,3	0,043	0,17	0	0,05	0,03	0	0,07	0,11	0,16	0,06	0,03	2,299	0,02	Des.	0,03	0,02	0,03	0,068	0,01	0,01	0	0,06	0,004	0,32
Alanina [mg]	42	31	149	0	43	23	142	0	44	70	0	41	200	15	59	25	11,5	29	35	20	22	32	41	14	15
Arginina [mg]	112	34	51	0	51	10	40	0	37	170	0	42	450	8	65	99	8,2	27	56	40	130	27	21	68	110
Acido aspártico [mg]	76	103	207	0	108	198	179	0	191	167	0	96	170	101	90	120	40	49	68	105	38	62	52	98	240
Acido glutámico [mg]	121	147	242	0	99	29	302	126	126	435	0	80	250	25	180	242	27	49	85	42	81	83	107	72	39
Cistina [mg]	8	16	5	0	2	3,2	64	7,6	7	70	0	9	30	1	Des.	2,6	0	3	6	2	10	14	0	123	6
Fenilalanina [mg]	54	28	95	0	32	13,5	51	27	25	120	0	25	140	9	60	51	7,4	7	38	10	19	28	2	27	85
Glicina [mg]	40	23	135	0	39	9,6	135	0	34	91	0	67	170	9	60	20	15	21	35	10	16	27	41	54	15
Histidina [mg]	20	14	26	0	72	10,3	40	17	16	60	0	10	60	6	30	11	4,1	5	14	6	22	13	7	60	6
Isoleucina [mg]	28	18	95	0	36	12,7	60	21	19	70	0	19	90	10	160	25	6,6	21	29	10	11	27	30	28	113
Leucina [mg]	79	34	168	0	80	16,7	62	47	44	140	0	18	170	16	250	28	13	27	49	15	22	46	55	46	74
Lisina [mg]	60	31	132	0	54	13,5	44	37	34	150	0	35	140	15	320	34	20,5	5	28	19	27	36	23	96	63
Metionina [mg]	18	10	37	0	8	4,8	22	1,1	1	30	0	10	20	3	70	7	1,6	3	9	3	9	5,5	5	45	3

Josefa Antonia Quiroz Troncoso

Prolina [mg]	80	85	97	0	38	27	150	0	27	0	0	37	Des.	10	Des.	153	8,2	Des.	Des.	47	80	24	25	45	4,6
Serina [mg]	46	28	106	0	46	16	94	36	33	70	0	19	120	12	50	37	12,3	24	24	26	22	24	24	Des.	7
Tirosina [mg]	30	13	62	0	20	4,78	43	31	29	40	0	14	63	5	Des.	11	4,1	12	18	7	10	17	10	52	8
Treonina [mg]	34	17	102	0	36	12,7	49	28	26	70	0	10	89	8	160	17	9	5	31	11	22	33	31	30	8
Triptófano [mg]	12	9	19	0	17	12,7	49	17	15	20	18	4	23	2	Des.	8	6,6	1	9	4	11	11	7	41	0,023
Valina [mg]	52	28	147	0	54	15,1	76	27	25	120	0	25	115	12	50	22	8,2	23	33	14	22	33	28	15	10
Glucosa [g]	0,5	0,9	0,1	4,42	5,55	3,36	25	0,99	2,24	0,1	4,32	1,4	2,3	2,03	0,5	2,02	3,6	3,91	1,8	2,38	7,2	7	1,5	59	4,2
Fructosa [g]	1,2	1,2	0,2	3,35	6,09	2,01	24,9	1,68	2,3	0,1	4,6	1,35	7,7	5,74	2,1	2,36	3,5	4,05	2,15	2,1	8,13	8	3,43	0,6	3
Sacarosa [g]	0,4	1	0,1	0,24	4,18	3,38	13,8	0,25	0,25	0,1	0,21	0,41	4,2	2,55	0,2	4,19	0	3,46	2,12	2,93	0,15	1	5,9	5,5	1,2
Almidón (g)	1	1	5	1	3,66	0,44	3,33	0,1	0,1	4,9	1,14	0,1	35	0,5	0,5	0	0,1	0,5	1	0,1	1	0,5	0	2,5	1
Ácidos orgánicos disponibles [g]	Des.	3,144	0	1,37	0,56	1,25	1,26	2,12	1,05	Des.	1,49	4,88	2,15	0,46	2	1,13	0,08	Des.	Des.	1,48	0	0,27	0,88	Des.	Des.
Oxálico [g]	0	0	0	0	0	0,01	0	0,04	0,02	Des.	1	0	Des.	0	Des.	0	0	0,04	0,0004	0	0	0	0	10	0
Cítrico [g]	0,34	0,003	0	0,52	0,314	0,03	0	1,74	0,75	Des.	1	4,68	0,194	0,03	1,17	1,04	0,05	0,68	0,36	1,3	0	0	0,01	1,6	1,61
Málico [g]	0,42	0,38	0	0,85	0,36	1,22	1,26	0,05	0,19	Des.	0,5	0,2	0,913	0,43	0,2	0,09	0,03	0,26	0,71	0,18	0	0	0,012	0,3	1,2
Fitosteroles totales [mg]	70	12	75	0	16	18,9	0	0	11,3	Des.	18	12	0,53	18	Des.	30	0	Des.	Des.	17	0	4	0	111,2	Des.
Beta-sitosterol [mg]	60	0,00006	76	0	11	15	0	0	8,2	Des.	0	2,5	0,254	11	Des.	22	0	Des.	0,11	13	0	0	0	10,46	0,12
Campesterol [mg]	4	0	4,1	1	2	1,6	0	0,6	0,7	Des.	0	0,6	0	0,9	Des.	3,8	0	Des.	0,87	2	0	0	0	2,4	0,087
Estigmasterol [mg]	6	0,00024	0,7	0	3	0	0	0	0,2	Des.	0	0,2	0	0	Des.	1,2	0	Des.	0,07	2	0	0	0	12,46	7,3
Polisacáridos no celular solubles [g]	0,0305	2,54	1,35	1,4	0,85	0,67	1,2	0,98	0,58	0,032	0,59	0	1,61	0,48	0,8	0,86	0,79	Des.	Des.	0,54	0	0,6	1,04	Des.	Des.
Polisacáridos no celular insolubles	0,015	9,625	1,36	0,81	0,41	0,68	2,38	0,56	0,48	0,36	0,42	0	13,03	0,91	Des.	0,29	0,16	Des.	Des.	0,27	0	1,21	1,32	Des.	Des.
Celulosa [g]	0,88	1,93	2,17	0,94	0,83	0,23	2,01	1,11	0,33	1,9	0,83	0	4,07	0,62	Des.	0,86	0,79	Des.	Des.	0,53	0	1,21	1,4	1,79	1,15
Lignina [g]	1,38	5,6	0,27	1,75	0,41	1	3,11	2,04	0,24	0,6	0,28	0	1,47	0,01	Des.	0,29	0,16	Des.	Des.	0,27	0	1	1,44	2,94	Des.

Des.: Desconocido

Anexo 2 | Porcentaje de capacidad antioxidante de diversas frutas obtenida mediante NaDES y Etanol al 70%.

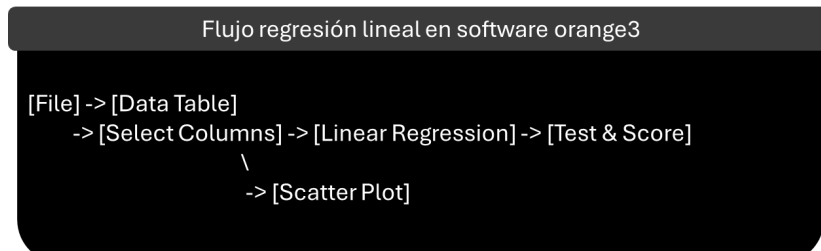
Frutas	Disolventes																														
	NADES 1	NADES 2	NADES 3	NADES 4	NADES 5	NADES 6	NADES 7	NADES 8	NADES 9	NADES 10	NADES 11	NADES 12	NADES 13	NADES 14	NADES 15	NADES 16	NADES 17	NADES 18	NADES 19	NADES 20	NADES 21	NADES 22	NADES 23	NADES 24	NADES 25	NADES 26	NADES 27	NADES 28	NADES 29	NADES 30	NADES 31
Acai	0.00	16.89	17.14	32.67	4.06	27.78	24.55	37.84	36.81	26.37	23.40	8.77	17.45	25.60	25.04	31.35	24.40	27.64	17.25	38.04	26.18	31.56	24.01	35.09	2.67	26.84	36.99	26.46	74.20		
Acerola	39.50	22.70	11.23	55.68	8.35	24.50	25.22	54.04	74.84	23.93	19.05	10.86	55.48	28.54	31.53	32.08	14.62	23.73	31.18	58.61	23.28	37.11	22.50	59.41	67.03	24.18	87.07	17.93	0.00		
Aguaate	20.81	16.28	15.62	17.22	18.74	19.64	17.05	10.59	7.97	10.41	17.60	11.91	11.97	15.25	17.21	24.57	10.90	15.51	0.00	7.69	4.23	35.93	0.00	6.02	0.00	15.19	1.73	20.55	0.00		
Arandano	17.13	61.06	62.05	82.15	64.84	70.61	71.59	82.63	73.96	57.81	51.58	0.00	61.64	71.53	74.42	80.84	63.28	60.77	55.93	73.97	70.35	81.75	68.16	85.84	41.73	66.02	82.54	70.52	61.90		
Banana	8.66	6.88	3.41	7.80	8.75	9.08	9.67	7.12	3.42	0.92	1.02	9.64	0.00	5.93	2.69	0.00	0.00	3.48	2.67	5.94	2.28	2.60	0.00	0.00	0.00	8.54	5.43	0.25	0.00		
Ciocola	2.46	28.09	25.86	43.77	21.25	48.86	38.98	33.54	39.42	23.40	32.70	0.00	23.22	31.61	34.46	39.90	29.46	38.26	26.52	26.82	34.40	73.76	10.27	28.80	7.37	26.56	25.29	17.34	40.79		
Dátil	23.50	11.43	4.86	7.44	13.35	14.93	13.78	7.13	2.45	2.99	15.27	9.52	9.30	14.60	13.46	10.22	4.73	13.46	9.45	3.41	6.51	20.06	3.70	4.06	2.86	10.46	2.54	2.27	1.80		
Frambuesa	24.73	65.35	39.72	84.81	61.89	55.10	45.05	49.22	48.00	42.62	19.90	2.98	33.95	53.99	37.76	45.09	46.08	66.41	38.94	83.83	49.76	69.74	46.66	56.16	23.67	58.59	42.54	42.35	45.63		
Fresa	22.71	32.70	25.57	66.88	41.73	63.11	54.27	48.29	41.92	40.55	44.13	0.00	41.31	55.64	47.03	52.93	30.79	41.92	75.72	45.66	37.45	45.55	42.00	41.81	17.64	70.96	56.40	23.36	64.34		
Guaraná	20.64	62.99	67.22	87.13	73.41	68.65	81.48	90.07	89.29	72.11	67.55	0.00	67.51	73.45	83.10	89.90	74.84	81.27	66.78	87.91	74.67	82.71	80.93	89.41	8.35	65.31	74.14	82.00	90.07		
Kivi	0.00	0.70	1.87	10.02	5.46	9.39	9.08	9.02	1.70	0.00	0.00	11.46	0.00	0.00	3.71	5.19	0.00	0.00	0.00	1.68	0.00	7.40	1.90	7.03	3.14	0.00	2.58	1.89	0.00		
Limon	15.65	19.31	21.23	34.93	19.85	23.64	25.77	30.16	34.88	17.44	20.63	10.79	22.27	26.55	26.91	32.65	26.10	24.39	22.19	41.12	22.81	87.43	23.39	22.36	27.40	22.80	14.50	30.25	28.52		
Lucuma	11.26	15.63	6.33	22.36	12.22	21.00	19.68	16.31	14.47	13.51	28.38	3.01	16.27	21.92	17.35	6.21	7.98	16.55	16.23	13.07	22.04	18.84	6.09	12.26	0.00	15.47	9.46	16.91	0.00		
Mansana	3.91	17.14	9.57	28.69	14.87	22.09	12.60	25.55	16.91	9.29	7.46	0.00	20.13	19.75	10.56	30.32	9.70	9.13	45.60	27.34	14.45	66.60	7.32	20.54	0.00	23.35	22.41	8.52	21.04		
Mangui	25.48	69.06	59.33	87.46	75.72	75.36	74.98	89.06	76.50	77.82	69.33	6.80	74.12	82.05	78.79	88.45	73.41	79.25	76.15	72.82	80.04	86.16	77.52	90.10	56.24	72.32	71.88	78.43	92.65		
Naranja	0.00	15.52	10.34	28.47	14.29	21.18	21.77	15.14	16.51	9.30	13.28	0.91	12.70	25.69	14.03	13.74	8.56	13.86	6.91	13.69	8.81	9.10	9.76	13.98	3.14	9.02	18.08	6.04	9.55		
Papaya	0.53	1.92	0.00	8.97	2.08	3.52	6.36	8.08	7.59	4.61	5.02	8.61	2.44	4.66	13.03	8.57	3.48	6.88	2.44	10.06	6.13	13.27	7.85	13.46	8.81	7.06	11.59	8.89	2.96		
Piña	0.00	7.17	4.24	3.38	0.21	16.59	0.00	10.76	16.67	8.64	8.07	0.00	2.53	12.35	4.65	16.75	0.49	0.49	0.33	11.78	0.00	1.48	13.13	20.30	7.38	3.34	15.78	5.34	0.00		
Pitaya	0.00	0.00	0.00	4.08	0.00	0.69	3.69	5.11	4.01	0.00	10.51	15.06	0.68	6.07	5.15	7.30	1.39	3.46	2.46	2.21	8.44	13.54	1.91	3.14	3.16	8.13	6.22	5.70	12.20		
Pomelo	0.00	0.00	7.29	9.31	0.00	0.00	1.38	5.59	7.14	1.91	6.56	12.25	0.00	0.77	2.86	6.07	6.89	5.35	6.42	10.49	1.50	5.19	1.86	6.59	14.86	3.64	11.94	2.42	1.19		
Synepalum	17.10	49.89	30.22	60.34	42.21	54.62	49.90	51.85	52.86	30.05	33.48	7.16	48.77	52.57	47.33	52.93	42.85	45.33	51.72	58.36	48.70	72.32	38.48	62.96	28.73	47.69	34.68	97.49	75.00		
Uva	1.55	28.31	20.97	46.46	30.37	41.63	29.69	35.54	22.57	21.04	21.01	12.22	36.23	41.47	31.21	40.02	30.43	31.09	40.25	39.28	40.55	60.95	27.61	30.26	3.96	26.16	30.15	29.29	48.51		
Arayán	N.D.	46.96	N.D.	29.65	N.D.	47.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	44.76	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	41.94	28.33	35.09	38.08	N.D.	34.14	N.D.	28.20	N.D.	N.D.	50.11		
Cesqui	N.D.	32.72	N.D.	16.29	N.D.	44.18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	46.38	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	41.19	11.68	25.25	25.42	N.D.	15.63	N.D.	30.53	N.D.	N.D.	27.45		
Chilco	N.D.	14.42	N.D.	24.63	N.D.	47.62	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	31.60	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	26.50	16.83	28.03	31.77	N.D.	23.22	N.D.	22.39	N.D.	N.D.	30.82		
Faijoo	N.D.	54.51	N.D.	46.38	N.D.	53.97	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	63.97	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	53.97	44.51	37.83	76.30	N.D.	51.44	N.D.	45.96	N.D.	N.D.	62.73		
Goldan	N.D.	0.00	N.D.	11.48	N.D.	7.24	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.62	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11.10	9.48	6.54	11.18	N.D.	10.31	N.D.	2.01	N.D.	N.D.	10.69		
Ginkgo	N.D.	8.78	N.D.	15.87	N.D.	15.96	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	18.12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.91	10.11	23.01	20.98	N.D.	11.56	N.D.	2.39	N.D.	N.D.	14.09		
Pumio	N.D.	58.37	N.D.	54.39	N.D.	65.43	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	67.55	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	61.36	47.29	60.45	76.18	N.D.	50.11	N.D.	61.40	N.D.	N.D.	57.88		
Tuna	N.D.	0.35	N.D.	7.74	N.D.	5.88	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.53	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.21	19.82	8.40	13.38	N.D.	9.03	N.D.	4.30	N.D.	N.D.	11.39		

N.D.: No disponibles

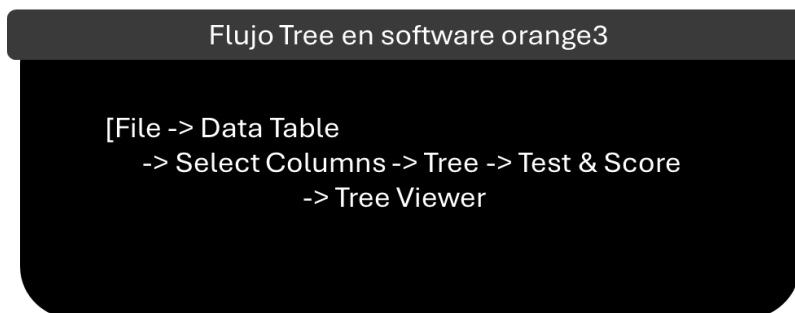
Anexo 3 | Especificaciones de los compuestos utilizados para el análisis HPLC (incluidos números CAS, proveedores y pureza). incluidos números CAS, proveedores y pureza).

Compound	CAS number	Supplier	Purity
Gallic acid	149-91-7	Sigma-Aldrich	≥ 97 wt. %
<i>Protocatechuic Acid</i>	99-50-3	Sigma-Aldrich	≥ 97 wt. %
Catechin	225937-10-0	Sigma-Aldrich	≥ 98 wt. %
Caffeic acid	331-39-5	Sigma-Aldrich	≥ 98 wt. %
Vanillin	121-33-5	Sigma-Aldrich	≥ 99 wt. %
Syringic acid	501-98-4	Sigma-Aldrich	≥ 95 wt. %
Rutin	207671-50-9	Sigma-Aldrich	≥ 94 wt. %
Cumaric acid	501-98-4	Sigma-Aldrich	≥ 98 wt. %
Ferulic acid	1135-24-6	Sigma-Aldrich	99 wt. %
Salicylic acid	69-72-7	Sigma-Aldrich	> 99 wt. %
Quercetin	849061-97-8	Sigma-Aldrich	≥ 95 wt. %
Cinamic acid	140-10-3	Sigma-Aldrich	≥ 99 wt. %
Acetonitrile (ACN)	75-05-8	Honeywell	HPLC grade
Water	7732-18-5	Honeywell	HPLC grade
Glacial Acetic acid	64-19-7	Labkem	≥ 99 wt. %

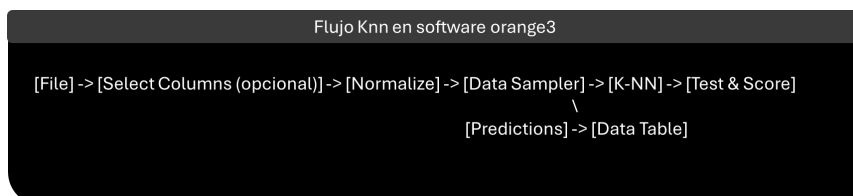
Anexo 4 | Diagrama de flujo para utilizar el widget de regresión lineal en el software Orange3.



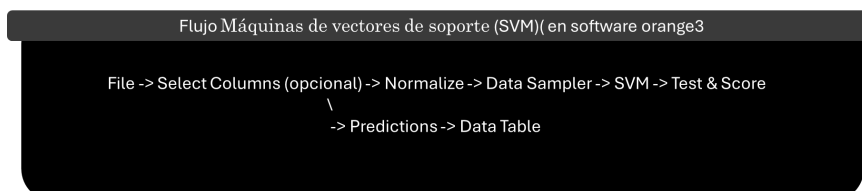
Anexo 5 | Diagrama de flujo para utilizar el widget Tree en el software Orange3



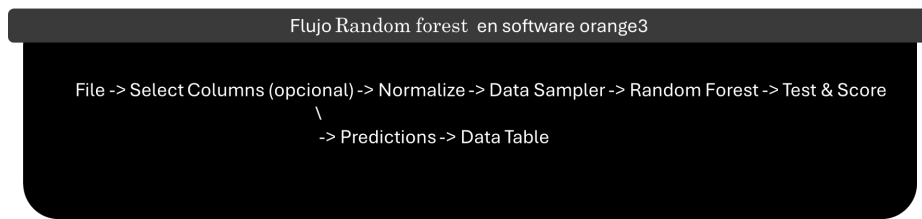
Anexo 14 | Diagrama de flujo para utilizar el algoritmo K-Nearest Neighbors (Knn) en el software Orange3



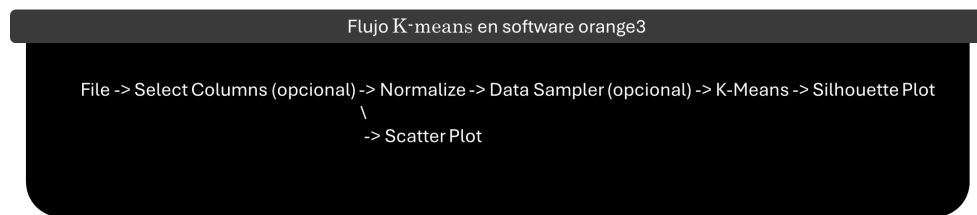
Anexo 15 | Diagrama de flujo para utilizar el algoritmo de Máquinas de Vectores de Soporte (SVM) en el software Orange3



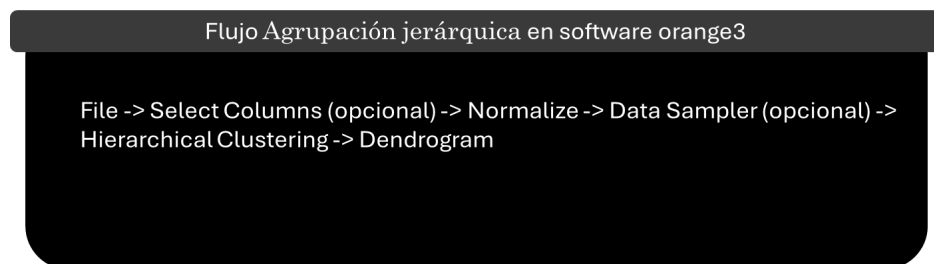
Anexo 23 | Diagrama de flujo para utilizar el algoritmo Árbol aleatorio (Random Forest) en el software Orange3



Anexo 27 | Diagrama de flujo para utilizar el algoritmo K-Medias en el software Orange3.



Anexo 28 | Diagrama de flujo para utilizar el algoritmo de Clustering Jerárquico en el software Orange3.



Anexo 32 | Artículo científico publicado (primer autor) en la revista International Journal of Molecular Sciences (primer cuartil o Q1) bajo el nombre “New Carbonate-Based Materials and Study of Cytotoxic Capacity in Cancer Cells”.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

New Carbonate-Based Materials and Study of Cytotoxic Capacity in Cancer Cells

Nayara Niza-Pérez ^{1,†}, Josefa Quiroz-Troncoso ^{2,3,†}, Nicolás Alegría-Aravena ^{2,4,5}, Santiago Gómez-Ruiz ¹, Diana Díaz-García ^{1,*} and Carmen Ramírez-Castillejo ^{2,6,*}

¹ COMET-NANO Group, Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, 28933 Madrid, Spain

² Centro de Tecnología Biomédica (CTB), Departamento Biotecnología-B.V. ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid, 28223 Madrid, Spain

³ Medicinal Gardens S.L. (Baña Food), 28008 Madrid, Spain

⁴ Grupo de Biología y Producción de Cérvidos, Instituto de Desarrollo Regional, Universidad de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain

⁵ Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)—Fundación Científica AECC, 02001 Albacete, Spain

⁶ Oncology Department, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: diana.diaz@urjc.es (D.D.-G.); mariadelcarmen.ramirez@upb.es (C.R.-C.);

Tel.: +34-910679290 (C.R.-C.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Calcium carbonate, one of the most commonly found biominerals produced by organisms, has shown great potential for the development of systems with biological applications due to its excellent biocompatibility, biodegradability, and simple chemical composition. Here, we focus on the synthesis of various carbonate-based materials with vaterite phase control and their subsequent functionalization for applications in treating glioblastoma, one of the most limiting tumors currently without effective treatments. The incorporation of L-cysteine into the systems increased cell selectivity while the incorporation of manganese supplied the materials with cytotoxic capacity. Extensive characterization of the systems by infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy, X-ray diffraction, X-ray fluorescence, and transmission electron microscopy confirmed the incorporation of the different fragments causing selectivity and cytotoxicity to the systems. To verify their therapeutic activity, the vaterite-based materials were tested in the CT2A cell line (murine glioma) and compared to SKBR3 (breast cancer) and HEK-293T (human kidney) cell lines. These studies on the cytotoxicity of the materials have shown promising results that can encourage future in vivo studies in glioblastoma models.



Citation: Niza-Pérez, N.;

Quiroz-Troncoso, J.; Alegría-Aravena,

N.; Gómez-Ruiz, S.; Díaz-García, D.;

Ramírez-Castillejo, C. New

Carbonate-Based Materials and

Study of Cytotoxic Capacity in

Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*,

5546. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/ijms24065546)

[ijms24065546](https://doi.org/10.3390/ijms24065546)

Anexo 33 | Artículo científico publicado (cuarto autor) en la revista Food Chemistry (primer cuartil o Q1) bajo el nombre “Quantification of lectins in *Synsepalum dulcificum* and comparison with reference foods”

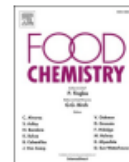
Food Chemistry 352 (2021) 129341



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Short communication

Quantification of lectins in *Synsepalum dulcificum* and comparison with reference foods



Adrián Menéndez-Rey^{a,b,*}, Raquel González-Martos^{a,b}, Peng Ye^{a,b}, Josefa Quiroz-Troncoso^{a,b}, Nicolás Alegría-Aravena^a, Marta Sánchez-Díez^a, Ceferino Maestu-Unturbe^a, Loan Bensadon-Naeder^b, Carmen Ramírez-Castillejo^{a,*}

^a CTB (CTB-UPM) Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, 28223 Pozuelo de Alarcón, Spain

^b Medicinal Gardens S.L (Baía Food), 28008 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Lectins
Synsepalum dulcificum
Miracle Berry
Hemagglutinins
Phaseolus vulgaris
Rubus idaeus

ABSTRACT

A healthy life means a balance between physical activity and a diet rich in fruits and vegetables, however, some plant-based foods can have certain adverse effects due to the presence of anti-nutritional factors, such as lectins, capable of binding molecules and preventing their normal assimilation. The level of lectins in *Synsepalum dulcificum* fruit was determined by hemagglutination assays in human blood, and its comparison with foods characterized as having high and low lectin content. The relative hemagglutinating activity of berries from *Synsepalum dulcificum* compared to our positive high lectin content food reference (Pinto bean) corresponds to 3.13–6.25%, representing safe levels for nutritional food.

Anexo 34 | Resolución favorable de comité ética para el uso de muestra de sangre humana



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID

**INFORME QUE EMITE EL COMITÉ DE ÉTICA
DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

A petición de la Vicerrectora de Investigación, Innovación y Doctorado de la Universidad Politécnica de Madrid,

D^a Asunción Gómez Pérez, de un dictamen sobre los aspectos éticos del

Proyecto "OPTIMIZACIÓN ESTADÍSTICA DE SUBPRODUCTOS DE INTERÉS EN LA SALUD HUMANA DERIVADOS DE SYNSEPALUM DULCIFICUM D. Y PLANTAS SIMILARES, UTILIZANDO MACHINE LEARNING", con referencia OEDSDIELSH-MDCRC-HUMANOS-20230926, cuyo investigador principal es María del Carmen Ramírez Castillejo, de Tecnologías para Ciencias de la Salud.

El Comité emite el siguiente informe:

El solicitante declara conocer los principios éticos y las normas legales que rigen las actividades de investigación y se compromete a respetar estos principios y normas en el desarrollo del estudio propuesto. Igualmente, se compromete a no modificar los protocolos de investigación y a solicitar una nueva autorización en caso de modificación.

En particular declara conocer y atenerse a lo dispuesto en

- *la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (64^a Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013)*
- *el Convenio de Oviedo relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina (Consejo de Europa, 1997)*
- *la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.*
- *la Circular 7/2004 de la AEMPS sobre investigaciones clínicas con productos sanitarios*
- *la Ley 14/2007 de Investigación biomédica*
- *el RD 1591/2009 que regula los productos sanitarios*
- *el RD 1616/2009 que se regula los productos sanitarios implantables activos*
- *la Ley 33/2011, de 4 de octubre, General de Salud Pública*
- *el RD 1716/2011 de biobancos y muestras biológicas*
- *el RD 9/2014 sobre la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos*
- *el RD 1090/2015 de ensayos clínicos con medicamentos*

Por lo tanto, no hay inconveniente en informar favorablemente la propuesta, recomendando el efectivo cumplimiento de los compromisos declarados.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Madrid.

La Presidenta del Comité

08621929A
ASUNCIÓN DE
MARIA GÓMEZ PÉREZ (E-
Q0878015P)

Asunción Gómez Pérez

El Secretario del Comité

DUEÑAS LÓPEZ JUAN CARLOS - DNI ****0290** with a certificate
issued by/com un certificado emitido por AC Sector Público

Juan Carlos Dueñas López

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Doctorado
Ramiro de Maeztu, 7. 28040 Madrid Tel +34 91 06 70175 secretaria.adjunto.vinvestigacion@upm.es