

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y
Bromatología



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Potencial de frutos rojos de la región andina de Ecuador frente a estrés oxidativo y envejecimiento. Caracterización de la fracción fenólica y bioactividad en sistemas modelo.

Emilia Mabel Guevara Terán

Salamanca, 2025



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN
Y BROMATOLOGÍA**

FACULTAD DE FARMACIA

Campus *Miguel de Unamuno* -37007 Salamanca
Teléf.: 923 294537 — Fax: 923 294515
e-mail: nutr@usal.es

El Dr. Celestino Santos Buelga, Catedrático del área de Nutrición y Bromatología; la Dra. Ana María González Paramás, Profesora Titular del área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca; y el Dr. José Miguel Álvarez Suárez, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, en calidad de directores del trabajo titulado "Potencial de frutos rojos de la región andina de Ecuador frente a estrés oxidativo y envejecimiento. Caracterización de la fracción fenólica y bioactividad en sistemas modelo", realizado por Dña. Emilia Mabel Guevara Terán en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han cumplido los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 13 de enero de 2025

Celestino Santos Buelga

Ana. M González Paramás

José.M Álvarez-Suárez

Para la realización del presente trabajo se ha contado con una beca predoctoral en la Universidad de Salamanca destinada a estudiantes latinoamericanos. Entidad financiadora: Banco Santander-Universidad de Salamanca, durante los cursos académicos 2022-2023 y 2023-2024.

A la Universidad de las Américas, por haberme brindado la oportunidad de ejercer en calidad de docente, durante mi formación doctoral.

Quiero expresar mi más sincera gratitud a mis directores de tesis, Celestino Santos Buelga, Ana María González Paramás y José Miguel Álvarez Suárez, cuya guía ha sido esencial a lo largo de este recorrido, tanto por sus valiosas aportaciones académicas como por el apoyo personal y profesional que siempre me brindaron.

A Celestino Santos Buelga y Ana María González Paramás les expreso mi más profundo agradecimiento por el apoyo incondicional y la generosidad con la que me acompañaron en este proceso. Desde el primer momento, su cercanía y calidez hicieron que enfrentar los desafíos de este camino, estando lejos de mi país, fuera una experiencia más enriquecedora y llevadera. Su orientación constante, paciencia y valiosos consejos enriquecieron no solo mi trabajo, sino también mi crecimiento personal. Han sido un ejemplo de profesionalismo y humanidad que siempre llevaré conmigo, y me siento profundamente agradecido por haber tenido la suerte de aprender de ustedes en cada etapa de este recorrido.

A José Miguel Álvarez Suárez, mi más profundo agradecimiento por ser más que un director, un verdadero mentor. Desde mis primeros pasos en esta aventura, estuviste a mi lado, guiándome con paciencia, compartiendo tu experiencia y motivándome a superar cada desafío. No solo me enseñaste a investigar, sino también a confiar en mis capacidades y a ver cada obstáculo como una oportunidad para crecer. Tu confianza en mí ha sido un motor esencial en este proceso.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Universidad de las Américas por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad académica. El entorno que me ofrecieron, junto con los recursos y el apoyo institucional, fue esencial para mi desarrollo profesional y para la culminación de este doctorado. Asimismo, deseo reconocer a Eduardo Tejera, cuyo papel como tutor fue fundamental durante este proceso. Su guía, experiencia y compromiso complementaron de manera excepcional el respaldo proporcionado por la universidad, siendo ambos pilares clave para alcanzar este importante logro.

Me gustaría agradecer también a Bego y a Lidia, por ser unas compañeras increíbles y un apoyo fundamental durante mi tiempo en el laboratorio. Su disposición, dedicación, cariño y experiencia fueron clave para mi aprendizaje y crecimiento a lo largo de este proceso. Gracias por transmitirme tanto, desde los pequeños detalles hasta los aspectos más complejos, siempre con la mejor actitud y disposición. Su compromiso y esfuerzo hicieron que mi experiencia en el laboratorio fuera realmente enriquecedora. Sin duda, este camino habría sido muy diferente sin ustedes. ¡Gracias de corazón!

A todos los compañeros del departamento, quiero expresar mi agradecimiento por contribuir a un ambiente tan positivo y agradable. Su disposición para colaborar, su apoyo constante, su interés y el tiempo compartido hicieron que esta experiencia fuera realmente especial.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis amigos en Salamanca: Ale, Pía, Alberto, Dirk, Joni, Isa, Eva, Rebe, Noe, Gus y Wills. A pesar de venir de diferentes rincones del mundo, juntos logramos algo muy especial, nos acogimos mutuamente y formamos una familia lejos de casa. Su amistad, apoyo y cariño me hicieron sentir siempre acompañado, incluso en los momentos más difíciles. Con ustedes, la distancia dejó de importar, y cada día se llenó de risas, recuerdos y un hogar compartido. Gracias por ser esa familia que jamás pensé encontrar, por darme tanto y por hacer que esta etapa sea inolvidable. Siempre los llevaré en mi corazón. También quiero dar las gracias, de corazón, a Daya, Leo, Mary, Migue, Dani, Nico, Carmen y Tania. Aunque nos separen un montón de kilómetros, siempre han estado ahí, haciéndome sentir que la amistad no tiene fronteras. Cada mensajito de ánimo, cada llamada sorpresa y cada pequeño detalle ha logrado hacerme sentir más cerca de casa, como si los abrazos pudieran llegar hasta mí a pesar de la distancia, llenándome el pecho de una calidez que no se compara con nada.

A mi familia, cuyo apoyo, cariño y amor infinito han sido el pilar fundamental que me permitió llegar hasta aquí. A mi papá, gracias por enseñarme con tu ejemplo a no rendirme. Saber que contaba con tus consejos, tu experiencia y, sobre todo, tu confianza, fue el impulso que me ayudó a superar cada reto. Ver tu orgullo en

mis avances me recordó siempre que el esfuerzo valía la pena. A mi mamá, gracias por tu amor inagotable y ese apoyo que supo devolverme la calma cuando más la necesitaba. En cada momento difícil, tus palabras reconfortantes me llenaron de la seguridad que requería para seguir adelante. Sentir tu fe constante en mí hizo que cualquier obstáculo pareciera más fácil de superar. A mi hermana, gracias por ser esa persona con quien podía hablar a cualquier hora, por entender mis dudas sin necesidad de demasiadas explicaciones y por saber siempre cómo darme el empujón que necesitaba. Su complicidad y su manera de acompañarme en alegrías y momentos difíciles me hicieron sentir comprendida, respetada y respaldada, como sólo una verdadera confidente sabe hacer. A los tres, gracias por sostenerme durante todo este proceso. Su cariño, apoyo y comprensión me dieron la fuerza que necesitaba, haciendo de cada paso un recuerdo valioso. Saber que estaban a mi lado, alentándome y creyendo en mí, hizo que esta experiencia fuera todavía más significativa.

El trabajo realizado en el desarrollo de esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos y comunicaciones a congresos:

Artículos:

✓ **Con resultados de la tesis doctoral**

Mabel Guevara-Terán, Eduardo Tejera, Wilson Vásquez-Castillo, Celestino Santos-Buelga, Ana M. González-Paramás, José M. Álvarez-Suarez. Influence of altitudes and development stages on the chemical composition and antioxidant capacity of Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth). *Frontiers in Nutrition* (2024), 11:15018.

Mabel Guevara-Terán, Katherine Padilla-Arias, Andrea Beltrán-Novoa, Ana M. González-Paramás, Francesca Giampieri, Maurizio Battino, Wilson Vásquez-Castillo, Paulina Fernandez-Soto, Eduardo Tejera, José M. Álvarez-Suarez. Influence of Altitudes and Development Stages on the Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Capacity of the Wild Andean Blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Molecules* (2022), 27: 1-23.

✓ **Artículos relacionados**

Andrea Beltrán-Novoa, Alejandro Jordan-Álvarez, **Mabel Guevara-Terán**, Blanca Gallo, Luis A. Berrueta, Francesca Giampieri, Maurizio Battino, José M. Álvarez-Suarez, Eduardo Tejera. Exploring the Chemistry of *Ocimum* Species under Specific Extractions and Chromatographic Methods: A Systematic Review. *ACS Omega* (2023), 8: 10747-10756.

Mabel Guevara-Terán, Ana M González-Paramás, Francesca Giampieri, Eduardo Tejera, José M. Álvarez-Suarez. Influence of Altitude on the Physicochemical Composition and Antioxidant Capacity of Strawberry: A Preliminary Systematic Review and Meta-Analysis. *Phytochemistry Review* (2022), 34: 1-18.

Andrea Beltran-Noboa, John Proaño-Ojeda, **Mabel Guevara-Terán**, Blanca Gallo, Luis Berrueta, Francesca Giampieri, Yunierkis Perez-Castillo, Maurizio Battino, Jose M. Alvarez-Suarez, Eduardo Tejera. Metabolomic profile and computational analysis for the identification of the potential anti-inflammatory mechanisms of action of the traditional medicinal plants *Ocimum basilicum* and *Ocimum tenuiflorum*. *Food and Chemical Toxicology* (2022), 164: 1-12.

Comunicaciones a congresos:

III Jornadas de jóvenes investigadores. Comunicación oral: Influencia de la altitud y etapas de madurez en la composición química y capacidad antioxidante del arándano andino (*Vaccinium floribundum* Kunth) y mora andina (*Rubus glaucus* Benth) silvestre. Celebrada en la Universidad de Salamanca el 5 y 6 de octubre de 2023. 2.

Primer Congreso Ecuatoriano de Jóvenes Investigadores. Comunicación Oral: "Efecto protector contra el daño oxidativo en fumadores de cigarrillos: un estudio ex vivo". Celebrado en la Universidad Yachay Tech-Quito del 16 al 19 de marzo de 2022

ABREVIATURAS

•OH: radical hidroxilo

A: cambio en la absorbancia

ABTS: (2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)

ACY: contenido total de antocianos

AMP: adenosín monofosfato

AMPK: quinasa activada por AMP

ARE: elementos de respuesta antioxidante

ATP: adenosín trifosfato

C: catequina

C3G: cianidina-3-*O*-glucósido

CaMKII: quinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina tipo II

CAT: catalasa

CBG: β -glucosidasa citosólica

CE: energía de colisión

CES: energía de colisión suplementaria

CG: ganglio cloacal

CHS: calcona sintasa

CND: cordón nervioso dorsal

CNV: cordón nervioso ventral

COMT: catecol-*o*-metiltransferasas

Ct: ciclo umbral (threshold cycle)

CTE: cadena de transporte de electrones

DAD: detector de espectrofotometría de diodos

DBEs: elementos de unión de DAF-16 (*DAF-16 Binding Elements*)

DE: desviación estándar

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DRG: ganglio dorsorrectal

EAG: equivalentes de ácido gálico

EC: epicatequina

EGC: epigallocatequina

EGCG: epigallocatequina-3-*O*-galato

EMS: *Enhanced MS*

EP: potencial de entrada

EPI: *Enhanced Product Ion*

ESI: onda de ionización por electrospray

ET: equivalentes Trolox

FC: folin-Ciocalteu

FD: factor de dilución

FRAP: poder antioxidante de reducción del hierro

FUdR: 5-fluoro-2'-desoxiuridina

GA: ácido gálico

GC: galocatequina

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión (forma reducida)

GSK: glucógeno sintasa quinasa

GST: glutatión-S-transferasa

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HSEs: elementos de choque térmico (*Heat Shock Elements*)

HSF: factor de transcripción de choque térmico

HSP: proteínas de choque térmico

IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor*)

IIS: señalización por insulina/IGF-1 (*Insulin/IGF-1 Signaling*)

ILPs: péptidos similares a la insulina

JNK: quinasas c-Jun N-terminal (*Jun N-terminal Kinases*)

I: paso óptico de celda

LG: ganglio lumbar

LOO[•]: radicales peroxilo lipídico

LPH: lactasa-floricín hidrolasa

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MDP: microplásticos de poliestireno

MS: espectrometría de masas

MTL: metalotioneína

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NGM: *Nematode Growth Medium*

NO[•]: óxido nítrico

NO₂[•]: dióxido de nitrógeno

NQO: quinona oxidorreductasa

NQO-1: NAD(P)H-quinona oxidorreductasa

NRF2: factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (*Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2*)

PAG: ganglio preanal

PAL: fenilalanina amonio liasa

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDK: quinasa dependiente de 3-fosfoinositol

PF: Peso de fruta fresca

PI3K: quinasa3-OH fosfatidilinositol

PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PM: masa molecular

Q: quercetina

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RLE-1: proteína de la familia de metiltransferasas de arginina)

RNS: especies reactivas de nitrógeno

RO•: radical alcoxilo

ROO•: radical peroxilo

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT: transcripción reversa

RTK: tirosina quinasas receptoras

RVG: ganglio retrovesicular

SGK: quinasa inducible de suero y glucocorticoide

SGLT: transportador de glucosa dependiente de sodio

sHSP: proteínas de choque térmico pequeñas

SOD: superóxido dismutasa

SPE: extracción en fase sólida

SULT: sulfotransferasas

TAC: capacidad antioxidante total

TFA: ácido trifluoroacético

TFC: contenido de flavonoides totales

TPC: contenido de polifenoles totales

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

TR: tiempo de retención

UGTs: uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas

UV: ultravioleta

VG: ganglio ventral

XO: xantina oxidasa

ε: coeficiente de extinción molar

ÍNDICE

I.	INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1	Mortiño o arándano Andino (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	5
2.1.1	Características generales.....	7
2.1.1.1	Taxonomía.....	8
2.1.2	Composición química y nutricional.....	8
2.2	Mora Andina (<i>Rubus glaucus</i> Benth).....	9
2.2.1	Características generales.....	9
2.2.1.1	Taxonomía.....	11
2.2.2	Composición química y nutricional.....	12
2.3	Compuestos fenólicos.....	13
2.3.1	Descripción y características generales.....	13
2.3.2	Clasificación estructura y presencia en los alimentos.....	15
2.3.2.1	Flavonoides.....	17
2.3.2.2	No flavonoides.....	26
2.3.3	Factores que influyen en la disponibilidad de compuestos fenólicos en las plantas.....	29
2.3.4	Actividad y disponibilidad de los compuestos fenólicos.....	32
2.3.4.1	Estudios epidemiológicos.....	32
2.3.4.2	Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos.....	33
2.3.4.2.1	Absorción.....	35
2.3.4.2.2	Metabolismo.....	38
2.3.4.2.3	Transformación de los compuestos fenólicos por el microbiota intestinal.....	39
2.3.4.2.4	Estudios de biodisponibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos de bayas en humanos.....	45
2.3.4.3	Actividad antioxidante.....	48
2.3.4.3.1	Captación de radicales libres (ROS).....	49
2.3.4.3.2	Actividad quelante de metales.....	52
2.3.4.3.3	Capacidad para modular enzimas pro-oxidantes.....	54
2.3.4.4	Estrés oxidativo en el envejecimiento	55
2.4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	57
2.4.1	Características generales.....	57
2.4.2	Anatomía.....	59
2.4.3	Ciclo de vida.....	68
2.4.4	<i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	71
2.4.4.1	Rutas moleculares y genes implicados en el envejecimiento y respuesta a estrés.....	72
2.4.5	Estudios sobre bayas en <i>Caenorhabditis elegans</i>	80

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
3.1 Materiales y equipos.....	85
3.1.1 Equipos.....	85
3.1.2 Materiales, reactivos y disolventes.....	86
3.1.3 Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	87
3.1.4 Recolección de frutos de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) y mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth).....	87
3.2 Métodos.....	93
3.2.1 Preparación de los extractos hidroalcohólicos de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) y mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth).....	93
3.2.2 Determinación de polifenoles totales (TPC), flavonoides (TFC) y contenido total de antocianos (ACY).....	93
3.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante.....	95
3.2.4 Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS.....	97
3.2.5 Preparación de placas Petri NGM (Nematode Growth Medium).....	100
3.2.6 Preparación <i>Escherichia coli</i> OP50 como fuente de alimento.....	100
3.2.7 Sembrado de <i>C. elegans</i> en placas NGM.....	101
3.2.8 Sincronización de <i>C. elegans</i>	102
3.2.9 Preparación de placas Petri para los ensayos con extractos de mora y mortiño.....	104
3.2.10 Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente.....	104
3.2.11 Ensayos de longevidad.....	105
3.2.12 Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa.....	106
3.2.13 Análisis estadísticos.....	108
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
4.1 Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	109
4.1.1 Caracterización de los extractos fenólicos del mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	109
4.1.2 Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos fenólicos del mortiño.....	120
4.2 Mora Andina (<i>Rubus glaucus</i> Benth).....	124
4.2.1 Caracterización de los extractos fenólicos de la mora andina (<i>Rubus glaucus</i> Benth).....	124
4.2.2 Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos fenólicos de la mora andina.....	135
4.3 Estudios en <i>Caenorhabditis elegans</i>	138
4.3.1 Efectos de los extractos fenólicos de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) y mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth).....	138
4.3.2 Efectos de los extractos fenólicos de mortiño y mora sobre la duración de vida en <i>Caenorhabditis elegans</i>	144

4.3.3	Influencia de los tratamientos con extractos de mortiño y mora sobre los genes relacionados con la resistencia al estrés y la vía de señalización de la insulina.....	151
V.	CONCLUSIONES GENERALES.....	169
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	173

I. INTERÉS Y OBJETIVOS

El interés de esta investigación radica en la evaluación integral de los compuestos fenólicos presentes en frutos andinos como el mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) y la mora andina (*Rubus glaucus Benth*), destacando su potencial como fuentes naturales de agentes bioactivos con propiedades antioxidantes y beneficios funcionales para la salud humana. Estos frutos, provenientes de ecosistemas de alta montaña presentan una elevada acumulación de metabolitos secundarios debido a las condiciones ambientales extremas, como la exposición intensa a radiación ultravioleta (UV), temperaturas fluctuantes y bajas concentraciones de oxígeno. Estas condiciones de estrés abiótico son conocidas por inducir la expresión de rutas metabólicas secundarias relacionadas con la síntesis de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides y antocianos, compuestos con demostrada capacidad antioxidante y efectos biológicos en modelos experimentales y estudios epidemiológicos (Manach et al. 2004). Un aspecto central de este trabajo es analizar cómo la altitud y el grado de madurez de los frutos modulan su composición química y su actividad biológica.

La altitud ha sido ampliamente documentada como un factor determinante en la acumulación de antocianos y otros polifenoles, dado que las plantas cultivadas a mayores alturas están sujetas a mayor radiación UV-B, lo que estimula la actividad de enzimas clave en la biosíntesis de flavonoides (Zhang et al. 2022). De manera complementaria, el grado de madurez de los frutos influye en la concentración y distribución de metabolitos secundarios, ya que durante la maduración se producen cambios en el perfil fenólico, con un aumento en la acumulación de antocianos y una disminución de metabolitos precursores (Wang et al. 2014). Este trabajo persigue caracterizar estas variaciones para comprender cómo las condiciones ambientales y fisiológicas afectan el potencial bioactivo de estos frutos.

La investigación también tiene un enfoque en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la actividad biológica de los compuestos fenólicos, utilizando para ello el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Este nematodo es ampliamente reconocido por su alta conservación de rutas metabólicas y

genéticas respecto a mamíferos, incluyendo la vía de señalización de insulina/IGF-1, que regula procesos fundamentales como el estrés oxidativo, la longevidad y la resistencia celular (Ayuda-Durán et al. 2020). Mediante este modelo se intentará evaluar si los compuestos fenólicos, modulados por la altitud y la madurez, pueden influir sobre procesos celulares clave, incluyendo la expresión de genes relacionados con la protección frente al estrés oxidativo.

Desde una perspectiva aplicada, el interés de esta investigación también incluye la valorización del mortiño y la mora andina como materias primas para el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos. En el contexto actual, existe una demanda creciente de productos naturales con beneficios documentados para la salud, particularmente aquellos que pueden contribuir a la prevención de enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento y al estrés oxidativo, como las cardiovasculares y neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer. La identificación de las características bioactivas de estos frutos, junto con su impacto en un modelo vivo, como es *Caenorhabditis elegans*, contribuirá a fortalecer su posicionamiento en el mercado global como ingredientes diferenciados y de alto valor añadido.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, el **objetivo general** de esta tesis doctoral es avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de los efectos biológicos de los compuestos fenólicos presentes en frutos andinos, explorando su impacto en la resistencia al estrés oxidativo y la longevidad en *Caenorhabditis elegans*. Además, se busca determinar cómo factores ambientales, como la altitud de cultivo, y fisiológicos, como el grado de madurez de los frutos, influyen en la composición química y la actividad biológica de estos compuestos, vinculando estas variables con su potencial funcional en sistemas biológicos. Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- Analizar el perfil de compuestos fenólicos, incluyendo antocianos, flavonoides y otros metabolitos bioactivos, en extractos de mortiño y mora andina, utilizando HPLC-DAD-ESI/MS.
- Examinar cómo la altitud de cultivo y el grado de madurez de los frutos influyen en la acumulación de compuestos fenólicos y su actividad biológica en sistemas modelo.
- Determinar la capacidad antioxidante in vitro de los extractos mediante ensayos específicos para cuantificar su actividad reductora y/o neutralizante de radicales libres.
- Evaluar los efectos de los extractos fenólicos sobre la resistencia al estrés oxidativo utilizando *C. elegans* como organismo modelo.
- Analizar su influencia en la longevidad de *C. elegans*, identificando posibles mejoras asociadas a la ingesta de los compuestos bioactivos.
- Investigar la regulación de genes clave relacionados con la ruta de la insulina/IGF-1 y el estrés oxidativo, utilizando técnicas de RT-PCR y cepas transgénicas de *C. elegans*.
- Generar evidencia científica que respalde el uso de frutos andinos como ingredientes funcionales en alimentos y nutraceuticos, promoviendo su valorización y uso sostenible.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mortiño o arándano Andino (*Vaccinium floribundum* Kunth)

2.1.1 Características generales

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) o arándano andino forma parte de los frutos rojos y se caracteriza por ser un arbusto pequeño que alcanza una altura de aproximadamente 2,5 m (Aguilar, Ulloa, y Hidalgo 2001; Ávila-Rodríguez et al. 2007). Sus ramificaciones están formadas por hojas de 2 cm de largo, que presentan un borde aserrado o dentado, y flores, que pueden ser solitarias o agrupadas en racimos, de un tamaño inferior a 1 cm (Cobo et al. 2016; Torres, Trujillo, y Arahana 2010). Adicionalmente, los frutos se presentan en forma de bayas esféricas y lisas, con un diámetro que oscila entre los 5 y 10 milímetros (Figura II.1). A lo largo del proceso de maduración su color experimenta una transición, desde un tono verde inicial hacia tonos más oscuros, llegando incluso a un morado profundo cuando están completamente maduros (Guevara-Terán et al. 2022; Vega-Polo et al. 2020).



Figura II.1. Mortiño o arándano andino en su hábitat natural.

Fuente: (Torres, Trujillo, y Arahana 2010)

En América del Sur está distribuido especialmente por los países que recorren la Cordillera de los Andes. *Vaccinium floribundum* Kunth es endémico del norte de Sudamérica y se halla de forma silvestre entre Ecuador y Colombia (Schreckinger et al. 2010). Concretamente en Ecuador, esta especie crece de forma aislada o en grupos con otras especies en valles interandinos elevados y páramos a altitudes que oscilan entre 2200 y 3400 m.s.n.m. (Cobo et al. 2016; Vasco et al. 2009). Su distribución está estrechamente vinculada a la región

sierra, un área delimitada por las cordilleras Occidental y Oriental de los Andes. Esta región incluye valles interandinos, páramos y elevaciones volcánicas emblemáticas como el Chimborazo y el Cotopaxi, con altitudes que oscilan entre los 1,800 y 6,300 metros sobre el nivel del mar. Dentro de la Sierra, *Vaccinium floribundum* se encuentra con frecuencia en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (Vega-Polo et al. 2020) (Figura II.2.). En los páramos ecuatorianos, el clima es mayormente frío, con temperaturas que varían entre 8 y 16 °C, influenciadas por la alta altitud y la considerable neblina y radiación solar durante el día (Cobo et al. 2016). Además, los suelos de los páramos suelen ser húmedos, lo que proporciona las condiciones ideales para el crecimiento de *Vaccinium floribundum* Kunth (Santamaría et al. 2012).

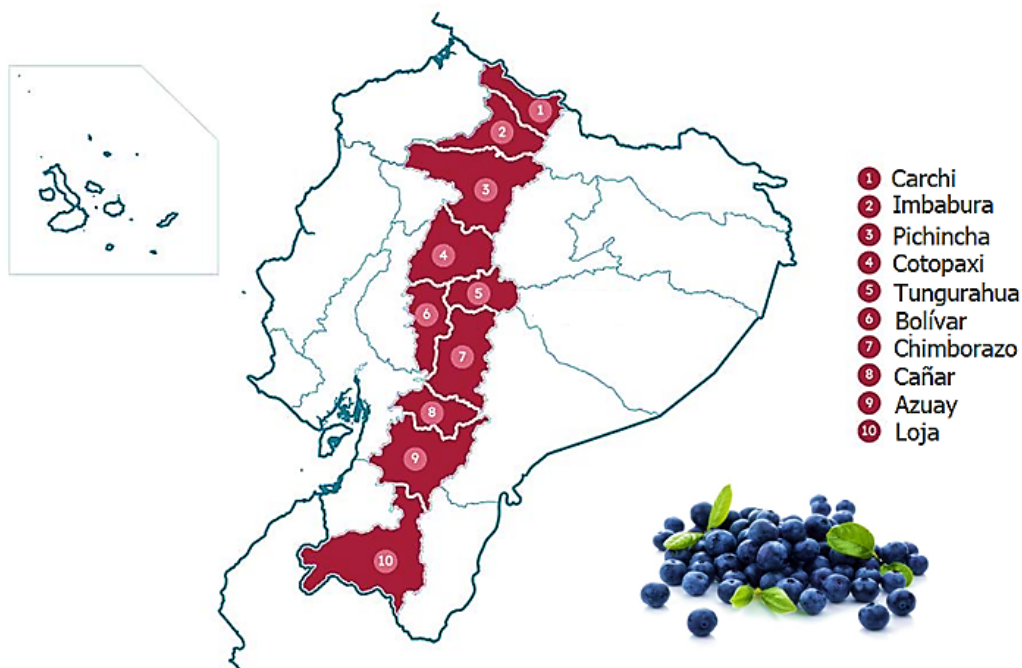


Figura II.2. Mapa de Ecuador que muestra las principales provincias de recolección de mortiño (*V. floribundum* Kunth).

Fuente: Adaptado de (Gómez 2012)

Actualmente, no se lleva a cabo un cultivo sistemático del mortiño. Su producción se limita principalmente a la recolección de los frutos silvestres en los páramos, donde su presencia es evidente año tras año. Cabe mencionar que el crecimiento natural del fruto se observa típicamente entre los meses de octubre

y diciembre de cada año (Roldán 2012; Vega-Polo et al. 2020). Actualmente, *V. floribundum* Kunth se consume como fruta fresca. A pesar de que su uso comercial sigue siendo limitado, sus bayas se comercializan en los mercados locales y son empleadas para la preparación de una bebida tradicional llamada "Colada Morada", consumida principalmente durante el Día de los Difuntos como parte de la cultura ecuatoriana (Alarcón-Barrera et al. 2018; Vasco et al. 2009). Sin embargo, hoy en día, su uso ha despertado un interés gastronómico para la elaboración de mermeladas, jaleas, helados, salsas e incluso vino, debido a sus características organolépticas (Monge-Sevilla et al. 2024; Tupuna, Vera, y Ruales 2016) .

2.1.1.1 Taxonomía

El mortiño pertenece a la familia de las Ericáceas, en la que se engloba gran parte de la vegetación montañosa tropical, adaptándose especialmente a entornos montañosos, húmedos y fríos (Cobo et al. 2016). Dentro de esta familia, el género *Vaccinium* es uno de los más abundantes, con 450 especies distribuidas desde Asia hasta los Andes. La mayor densidad geográfica del género *Vaccinium* se ha reportado en Sudamérica, en países como Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Guirado, Cuéllar y Prieto 2008). En la Tabla II.1 se detalla la descripción taxonómica del mortiño.

Tabla II.1. Taxonomía del mortiño o arándano andino
Fuente: (Gallardo-Puente 2015)

Nombre Científico	<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Vaccinium
Epíteto Específico	Floribundum
Autor Epíteto Específico	Kunth

2.1.2 Composición química y nutricional

Estudios previos han evaluado la fitoquímica del mortiño, identificando una diversidad de componentes químicos y nutricionales que permiten clasificar esta baya como un alimento de alto valor biológico. Dichos componentes incluyen una gran cantidad de compuestos antioxidantes, como carotenoides, ácido ascórbico o fenilpropanoides, incluyendo flavonoides (especialmente antocianos) y taninos (Gallardo-Puente 2015; Guevara-Terán et al. 2022; Ortiz et al. 2013). Estos compuestos se han asociado con efectos protectores significativos contra enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el daño oxidativo (Cobo et al. 2016).

Por otro lado, el mortiño posee una variedad de micronutrientes entre los que cabe señalar diferentes minerales, como fósforo y sodio, que contribuyen a la fijación del calcio en los huesos; magnesio, que interviene en el funcionamiento óptimo de los músculos y el sistema nervioso, y hierro, crucial para la producción de hemoglobina. Asimismo, presenta cobre, fundamental en la formación de glóbulos rojos y en la eliminación de radicales libres; calcio, primordial en la estructura de huesos y dientes y la regulación de la contracción muscular; o zinc, que participa en el crecimiento y la regeneración de tejidos (Santamaría et al. 2012). Además de minerales, contiene azúcares, sobre todo glucosa, que proporciona energía para las funciones celulares, y fructosa, que se metaboliza lentamente en el cuerpo y es tolerada por personas con diabetes. Entre los ácidos destacan el ácido cítrico, que actúa como regulador del pH, y el ácido málico, con propiedades astringentes (Tupuna, Vera y Ruales 2016). En la Tabla II.2 se detallan los principales macro y micronutrientes presentes en el mortiño, junto con sus respectivas concentraciones por cada 100 g.

Tabla II.2. Composición química y nutricional del fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Fuente: (Tupuna, Vera, y Ruales 2016)

Parámetro	Concentración
Humedad (g/100 g PF) ¹	81,0 ± 0,2
Proteínas (g/100 g PF) ¹	0,8 ± 0,02
Ceniza (g/100 g PF) ¹	0,3 ± 0,01
Carbohidratos totales (g/100 g PF) ¹	16,9 ± 0,1
Fibra dietética total (g/100 g PF) ¹	7,6 ± 2,2
<i>Fibra dietética soluble</i>	1,2 ± 1,0
<i>Fibra dietética insoluble</i>	6,5 ± 2,5
Azúcares solubles (g/100 g PF) ¹	
<i>Fructosa</i>	4,4 ± 0,4
<i>Glucosa</i>	2,6 ± 0,3
Valor calórico (Kcal/100 g) ¹	84,0 ± 0,4
Ácidos orgánicos (mg/100 g PF) ¹	
<i>Ácido cítrico</i>	1186 ± 74,5
<i>Ácido málico</i>	451,5 ± 14,9
Iones metálicos (mg/100 g PF) ¹	
<i>Hierro (Fe)</i>	0,8 ± 0,2
<i>Potasio (K)</i>	142 ± 1,9
<i>Calcio (Ca)</i>	15,5 ± 1,1
<i>Magnesio (Mg)</i>	21,2 ± 1,9
<i>Cobre (Cu)</i>	0,1 ± 0,02
<i>Zinc (Zn)</i>	0,2 ± 0,02
Antioxidantes	
<i>Ácido ascórbico (mg/100 g)</i> ¹	9.0 ± 2.0
<i>β-caroteno (μg/100 g)</i> ¹	36.0 ± 6.0

¹ Los resultados se expresan como media ± DE. PF: Peso de fruta fresca

2.2 Mora Andina (*Rubus glaucus* Benth)

2.2.1 Características generales

La mora Andina o mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), también conocida como zarzamora, es una fruta silvestre originaria de América, específicamente de las zonas altas tropicales del continente (Carrillo-Perdomo et al. 2015). Fue en el año 1840, cuando el botánico alemán Karl Theodor Hartweg recolectó por primera vez plantas de "mora de Castilla" en huertos artesanales cercanos a la ciudad de Quito, Ecuador. Durante la época colonial, en Quito se usaba el término "Castilla" para designar productos de excelente calidad y características superiores, debido a su supuesta procedencia española. Por esta razón, se

popularizó como 'mora de Castilla' en el comercio local. Sin embargo, con el tiempo, la ciencia y la botánica permitieron distinguirla como de origen ecuatoriano y destacar su procedencia nativa (Ayala et al. 2016).

La mora es un arbusto perenne de naturaleza trepadora, que puede alcanzar una altura de hasta 3 metros. Sus hojas son trifoliadas, alternas y elípticas, con un borde ligeramente dentado y ondulado. Las flores son hermafroditas y de color blanco, con un diámetro que oscila entre 2 a 2,5 cm (Ayala et al. 2016). Una planta promedio puede producir hasta 3600 frutos distribuidos en gajos de 5 a 8 bayas, cada una con una maduración dispareja. Dependiendo del grado de madurez, el color de los frutos puede variar desde un rojo púrpura brillante hasta un negro rojizo. La forma del fruto es cónica, compuesta por entre 70 y 100 pequeñas bayas, y su tamaño puede oscilar entre 15 y 20 mm de diámetro (Figura II.3) (Alarcón-Barrera et al. 2018).

Figura II.3. Mora de Castilla en su hábitat natural.
Fuente: (Ayala et al. 2016)

Las áreas de cultivo de *Rubus glaucus* Benth se encuentran en las estribaciones de los Andes del Ecuador, situadas entre los 2200 y 3200 metros sobre el nivel del mar, abarcando provincias como Tungurahua, Bolívar, Pichincha, Imbabura, Chimborazo, Carchi y Cotopaxi (Ayala et al. 2016). No obstante, la mayor concentración de producción se localiza en la provincia de Tungurahua, específicamente en las zonas de Tisaleo, Ambato y Cevallos,

durante la temporada de maduración entre septiembre y noviembre (Figura II.4) (Cevallos 2020). El uso comercial de esta especie es alto. En los mercados, las moras se consumen principalmente como fruta fresca o como productos procesados, como pulpa congelada, mermelada, jugo, vino o té (Skrovankova et al. 2015).

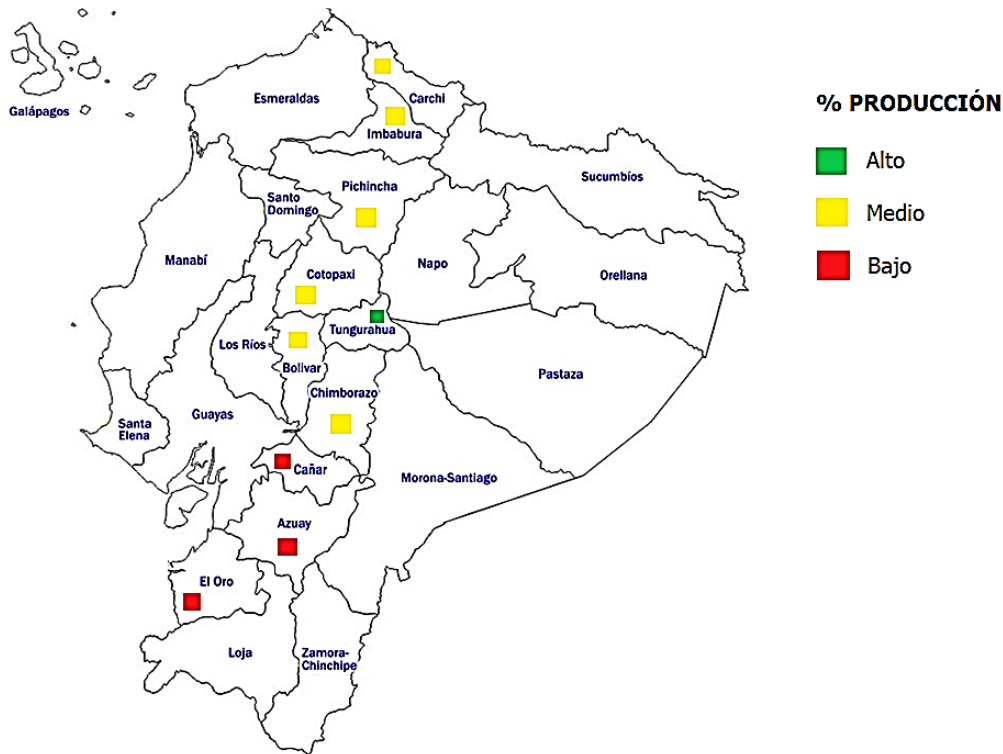


Figura II.4. Mapa de Ecuador que muestra las principales provincias de producción de mora de Castilla (*R. glaucus* Benth).

Fuente: Adaptado de (D-maps 2008)

2.2.1.1 Taxonomía

Rubus glaucus Benth pertenece a la familia Rosaceae, una de las familias botánicas más estudiadas. El género *Rubus* incluye alrededor de 300 especies aceptadas siendo *Rubus glaucus* una de las más destacadas y cultivadas en Latinoamérica. En 1845 se le otorgó este nombre científico a la "mora de Castilla", donde el término "Rubus" se originó del latín "ruber", que significa rojo, mientras que "glaucus" hace alusión al color verde claro de las ramas y hojas de la planta (Romoleroux y Forero 1996). En la Tabla II.3 se detalla su descripción taxonómica.

Tabla II.3. Taxonomía de la mora de Castilla

Fuente: (Romoleroux y Forero 1996)

Nombre Científico	<i>Rubus glaucus</i> Benth
Reino	Plantae
División	Antofita
Clase	Dicotiledónea
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Rubus</i>
Epíteto Específico	<i>Glaucus</i>
Autor Epíteto Específico	Benth

2.2.2 Composición química y nutricional

Los estudios de composición de esta especie han brindado una descripción general del fruto, proporcionando además información relevante sobre sus componentes químicos y nutricionales. Estos frutos sobresalen por sus altos niveles de nutrientes, siendo una importante fuente de vitaminas (A, B y C), minerales (calcio, cobre, hierro, fósforo, magnesio, potasio, sodio, selenio y zinc) y azúcares. Además, la mora de Castilla es una fuente natural rica en compuestos fenólicos, principalmente flavonoides como antocianos (derivados de cianidina y pelargonidina), flavonoles y flavanoles, así como ácidos fenólicos del grupo de los ácidos hidroxicinámicos (en forma de glicósidos o ésteres con azúcares o ácido quínico) y taninos hidrolizables (derivados de los ácidos elágico y gálico). Esta composición la coloca como un alimento funcional. Estudios epidemiológicos sugieren que su consumo regular puede tener efectos beneficiosos para la salud, como la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer.

En la Tabla II.4 se detallan los macro y micronutrientes presentes en la mora de Castilla, junto con sus respectivas concentraciones por cada 100 g.

Tabla II.4. Composición química y nutricional de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

Fuente: (Ayala et al. 2016)

Componentes	Concentración (g/100 g)
Humedad (g/100 g PF) ¹	87,4 ± 1,0
Proteína (g/100 g PF) ¹	1,39 ± 0,01
Ceniza (g/100 g PF) ¹	0,37 ± 0,02
Carbohidratos totales (g/100 g PF) ¹	9,61 ± 0,2
Fibra dietética total (g/100 g PF) ¹	5,3 ± 2,1
Azúcares solubles (g/100 g PF) ¹	
<i>Fructosa</i>	2,4 ± 0,2
<i>Glucosa</i>	2,31 ± 0,4
<i>Maltosa</i>	0,07 ± 0,2
Valor calórico (Kcal/100g)	82,0 ± 0,3
Vitaminas del complejo B (mg/100 g PF) ¹	
<i>Ácido pantoténico</i>	0,27 ± 0,2
<i>Ácido fólico</i>	0,21 ± 0,4
Iones metálicos (mg/100 g PF) ¹	
<i>Hierro (Fe)</i>	0,62 ± 0,1
<i>Potasio (K)</i>	162 ± 0,3
<i>Calcio (Ca)</i>	29 ± 1,3
<i>Magnesio (Mg)</i>	20 ± 1,1
<i>Cobre (Cu)</i>	0,165 ± 0,01
<i>Zinc (Zn)</i>	0,53 ± 0,03
Antioxidantes	
<i>Ácido ascórbico (mg/100 g)</i>	21 ± 3,0
<i>β-caroteno (μg/100 g)</i>	128 ± 4,0

¹ Los resultados se expresan como media ± DE. PF: Peso de fruta fresca

2.3 Compuestos fenólicos

2.3.1 Descripción y características generales

Los compuestos fenólicos, también llamados comúnmente polifenoles, constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Mahmoudi et al. 2016). Las plantas sintetizan estos compuestos a través de las vías metabólicas del ácido siquímico/fenilpropanoide y del acetato/malonato, o mediante una combinación de ambas (Quiñones, Miguel, y Alexandre 2012). Los polifenoles están involucrados en diferentes funciones de la ecofisiología vegetal. Actúan como agentes alelopáticos, señalizadores en la fijación de nitrógeno, atrectores para

polinizadores y animales dispersantes de semillas, y protectores contra la depredación por herbívoros, radiación ultravioleta e infecciones microbianas (Ignat, Volf, y Popa 2011)

En la naturaleza, pueden encontrarse de forma libre (aglicones) o como derivados glicosilados, prenilados o acilados. En los alimentos y otros tejidos vegetales, los ácidos fenólicos tienden a formar combinaciones con polioles como la glucosa o el ácido quínico, mientras que los flavonoides, estilbenos o lignanos suelen encontrarse principalmente en forma glicosilada, a excepción de los flavan-3-oles, que se hallan principalmente como aglicones. Los azúcares se unen a los flavonoides generalmente a través de enlaces éter entre grupos hidroxilo, aunque en algunos casos también pueden estar enlazados a un átomo de carbono aromático. El azúcar más común es la glucosa, pero también la galactosa, ramnosa y arabinosa, y los disacáridos rutinosa (α -1-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -d-glucopiranososa) y neohesperidosa (α -1-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -d-glucopiranososa) son habituales. Además, estos azúcares también pueden estar esterificados con ácidos alifáticos (por ejemplo, ácidos acético o malónico) o aromáticos (como ácidos cafeicos, *p*-cumárico, o ferúlico) (Santos-Buelga y González-Paramás, 2014).

Estos compuestos se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal y, por lo tanto, son una parte integral de la dieta humana. Por lo general, los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles, con concentraciones variables incluso dentro de un mismo alimento. Se ha estimado que la ingesta diaria promedio de polifenoles es de aproximadamente 1 g, lo que supera significativamente la ingesta de vitamina C y vitamina E (Ignat, Volf, y Popa 2011).

Por otro lado, algunos polifenoles actúan como pigmentos naturales, otorgando color y sabor a los alimentos, influyendo en la calidad, estabilidad y aceptabilidad de estos. Sin embargo, el creciente interés de los últimos tiempos hacia estos compuestos radica principalmente en sus propiedades biológicas. Estudios epidemiológicos han aportado evidencias que sugieren que la ingesta moderada y prolongada de compuestos fenólicos puede beneficiar la salud. Una dieta rica en polifenoles se ha relacionado con un menor riesgo de padecer

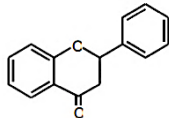
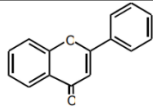
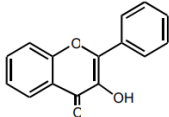
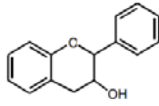
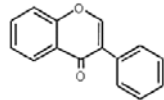
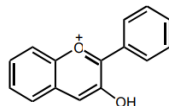
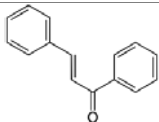
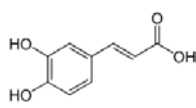
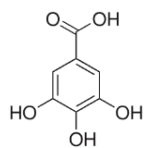
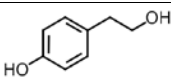
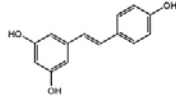
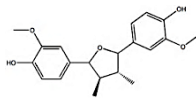
enfermedades crónicas y degenerativas como algunos tipos de cáncer, diabetes y trastornos cardiovasculares, neurodegenerativos y respiratorios, donde las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante (Fraga 2009; Potì et al. 2019; Santos-Buelga et al. 2019).

2.3.2 Clasificación estructura y presencia en los alimentos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo unidos. Se han descrito más de 8000 sustancias fenólicas diferentes, desde moléculas simples hasta altamente polimerizadas. Su clasificación depende del número y la disposición de los átomos de carbono de la estructura, distinguiéndose dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. Dentro de los flavonoides se encuentran las flavanonas, flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, antocianos y calconas, mientras que el grupo de los no flavonoides incluye, entre otros, ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), estilbenos y lignanos, así como alcoholes fenólicos y sus derivados secoiridoides (Tabla II.5).

Flavonoides y ácidos fenólicos son los más abundantes en la naturaleza, constituyendo aproximadamente el 60 % y el 30 % de los compuestos fenólicos, respectivamente (Zhou et al. 2016).

Tabla II.5. Estructuras básicas de los principales grupos de compuestos fenólicos.
Fuente: Modificado de (Santos-Buelga et al. 2012)

Clasificación	Estructura básica	Ejemplos representativos
Flavonoides (C6-C3-C6)	Flavanonas	 Naringenina, hesperidina,
	Flavonas	 Apigenina, crisina, luteolina
	Flavonoles	 Quercetina, miricetina, galangina, kaempferol, isoramnetina
	Flavan-3-oles	 (Epi)galocatequina, proantocianidinas, (epi)catequina
	Isoflavonas	 Daidzeína, genisteína
	Antocianos	 Malvidina, cianidina, delphinidina, perlangonidina
	Calconas	 Floretina, buteina, arbutina, chalcona de naringenina
No Flavonoides	Ácidos hidroxicinámicos (C6-C3)	 Ácido RTgénico, ácido ferúlico, ácido cafeico
	Ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1)	 Ácido gálico, ácido elágico, ácido protocatéquico
	Alcoholes fenólicos	 Tirosol, hidroxitirosol
	Estilbenos (C6-C2-C6)	 Resveratrol
	Lignanós (C6-C3) _n	 Sesamina, secoisolariciresinol

2.3.2.1 Flavonoides

Los flavonoides poseen una estructura básica compuesta por 15 átomos de carbono, los cuales forman dos anillos aromáticos (A y B) unidos por tres átomos de carbono (C6-C3-C6), que en la mayoría de las subclases forman un tercer anillo heterocíclico (anillo C) de tipo pirano (Figura II. 5). La clasificación habitual de los flavonoides se realiza de acuerdo con el grado de insaturación y sustituyentes del anillo C (Tabla II. 5) (Santos-Buelga y González-Paramás 2016)

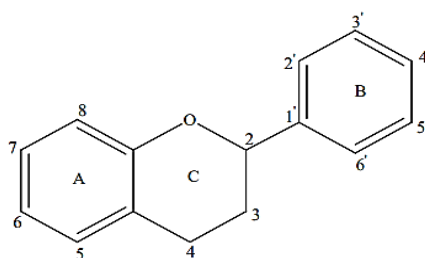


Figura II.5. Esqueleto básico de los flavonoides más abundantes.

Habitualmente, se encuentran hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' o 5'. En la naturaleza, se presentan mayormente en forma glicosilada (*O*-glicósidos y *C*-glicósidos), aunque también pueden encontrarse en forma conjugada, ya sea acetilados, sulfatados, metilados o prenilados, y como aglicones libres, así como formando estructuradas polimerizadas (taninos condensados) (Santos-Buelga y Gonzalez-Paramas 2014).

A escala mundial, se considera que los productos más consumidos e importantes, en términos de contenido en flavonoides, son el té verde y negro, el vino tinto y el cacao/chocolate. En un nivel secundario, se incluyen las frutas (especialmente bayas), verduras y legumbres (Santos-Buelga y González-Paramás 2016). La importancia de la presencia de los flavonoides en los alimentos no solo radica en sus propiedades organolépticas, sino más bien en los beneficios que ofrece a la salud humana su ingestión, tal y como respaldan estudios experimentales y epidemiológicos (Fraga 2009). Específicamente, en las bayas sobresalen flavonoides como flavonas, flavonoles y antocianos, reconocidos por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, aunque estudios recientes extienden su actividad biológica a la influencia que pueden

ejercer sobre mecanismos de señalización celular (Bilawal et al. 2021; Santos-Buelga et al. 2019)

a) Flavonoles

Los flavonoles son el subgrupo de flavonoides más común en los alimentos. Poseen una estructura básica de tipo 2-fenil-3-hidroxi-cromona y se caracterizan por tener un grupo cetónico en el carbono C4 y una insaturación entre C2 y C3 en el anillo C. Aunque la estructura química de los flavonoles guarda una estrecha relación con la de las flavonas, se diferencian por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C. Esta pequeña diferencia entre sus estructuras tiene importantes implicaciones fisiológicas y farmacológicas (Del Rio et al. 2013).

Actualmente, se han identificado más de 900 flavonoles distribuidos en la naturaleza en forma glicosilada. La posición de la sustitución más habitual es la 3, aunque también es frecuente la glicosilación en 3', 4' y 7. Estos compuestos están comúnmente presentes en la mayoría de las plantas superiores, y se distribuyen de manera heterogénea en sus frutos, flores, hojas y tallos (Brodowska 2017). A menudo, en frutas y verduras los flavonoles predominan sobre otros compuestos, destacando los conjugados glicosídicos de quercetina, miricetina, kaempferol e isoramnetina, que se distinguen por los sustituyentes del anillo B (Figura II.6) (Santos-Buelga y González-Páramas 2016).

Algunas especies de bayas cultivadas o silvestres contienen concentraciones especialmente altas de glucósidos de flavonoles, estando entre las principales fuentes de estos compuestos en la dieta humana. Se han detectado y cuantificado más de 50 flavonoles diferentes (glucósidos de quercetina, miricetina, kaempferol, isoramnetina y laricitrina) en bayas como arándanos, fresas, moras y frambuesas. En especies del género *Rubus* (*R. glaucus* y *R. adenotrichus*) se han identificado quercetina-glucurónido y quercetina-glucósido como los flavonoles más abundantes (Claudio Martins, Soares, y Rocha 2023; Mikulic-Petkovsek et al. 2012). En la Figura II.6 se recogen los aglicones de flavonoles más comunes en bayas.

Flavonoles	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Quercetina	OH	OH	H
Miricetina	OH	OH	OH
Kaempferol	H	OH	H
Isoramnetina	OCH ₃	OH	H
Laricitrina	OCH ₃	OH	OH

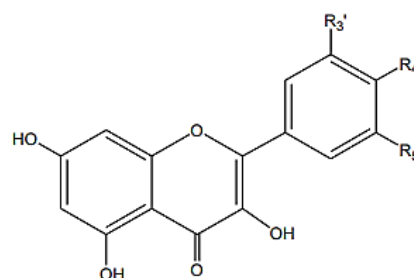


Figura II.6. Estructura química de los aglicones de flavonoles más habituales en bayas

b) Flavonas

Las flavonas son una clase de flavonoides basada en la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1-benzopiran-4-ona). Tienen un esqueleto de tres anillos, y están representadas principalmente por luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona), apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona), tangeretina (4',5,6,7,8-pentametoxiflavona) y crisina (5, 7-dihidroxiflavona) (Punia Bangar et al. 2023). En la Figura II.7 se recogen los aglicones de las flavonas frecuentes en vegetales.

Flavonas	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Luteolina	OH	OH	H
Apigenina	H	OH	H
Tangeretina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Crisina	H	H	H
Tricina	OCH ₃	OCH ₃	H
Acacetina	H	OCH ₃	H

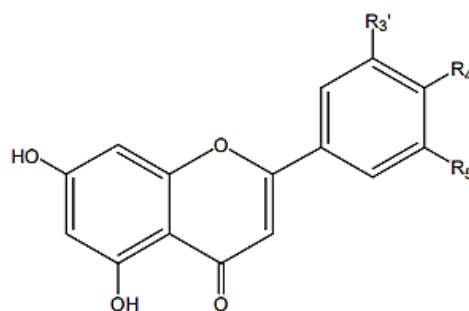


Figura II.7. Estructura de los aglicones de algunas flavonas.

Las flavonas son objeto de un interés creciente debido a su potencial antioxidante y su capacidad para modular varios sistemas enzimáticos implicados en diversas enfermedades. Además, son tanto lipófilas como hidrófilas, tienen funcionalidades polares en diferentes posiciones, y el esqueleto mismo es susceptible de generar funcionalidades para la modulación selectiva de diferentes

enzimas. A diferencia de los flavonoles, su distribución es más limitada, ya que solo se han reportado concentraciones significativas en apio, perejil y en algunas hierbas empleadas como condimentos (Zhao et al. 2019; Singh, Kaur, y Silakari 2014).

c) Flavanonas

Las flavanonas están distribuidas en aproximadamente 42 familias de plantas superiores, especialmente en Rutaceae, Compositae y Leguminosae (Brodowska 2017). Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado, por lo que también se denominan dihidroflavonas (Figura II.8). La estructura de la flavanona posee propiedades ópticas debido a que el carbono en la posición 2 del anillo heterocíclico es un centro de asimetría. Aunque se consideran un grupo minoritario de flavonoides, las flavanonas son los flavonoides mayoritarios en ciertos casos, como en el género Citrus. En el pomelo, la naringenina es el aglicón predominante, en la naranja es la hesperetina, y en el limón el eriodictiol (Di Majo et al. 2005). En los cítricos, las flavanonas se encuentran exclusivamente en forma glicosilada y se localizan principalmente en la cáscara (Jaganath y Crozier 2010) (Figura II.8).

Flavanonas	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Hesperetina	OH	OCH ₃	H
Eriodictol	OH	OH	H
Naringenina	K	OH	H
Taxifolina*	OH	OH	H

*hidroxilada adicionalmente en posición 3

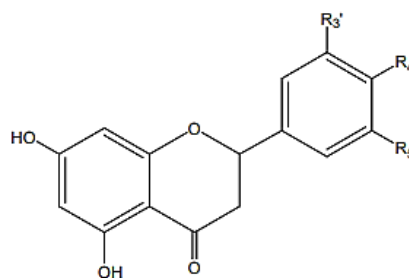


Figura II.8. Estructura química de algunas flavanonas de los alimentos.

Biogénicamente, las calconas son los precursores inmediatos de las flavanonas, y algunas de estas pueden isomerizarse en calconas mediante la apertura del anillo heterocíclico (Figura II.9) durante el aislamiento desde las plantas o tras un tratamiento químico con álcali.

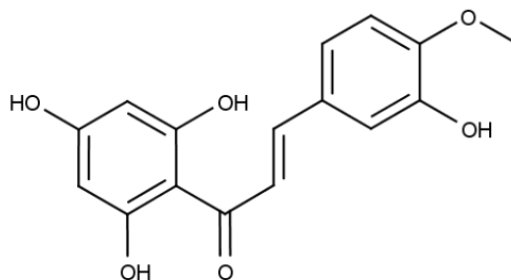


Figura II.9. Estructura química de la calcona de hesperetina.

Cabe destacar, que las flavanonas son intermediarios en la biosíntesis de la mayoría de los otros grupos de flavonoides, incluyendo flavonas, flavonoles e isoflavonoides (Cabrera et al. 2007). Estos compuestos destacan por su potencial antiproliferativo y antioxidante (Brodowska 2017).

d) Isoflavonas

Las isoflavonas tienen un esqueleto 3-fenilcromano, que se origina biogenéticamente a partir de la reestructuración del sistema flavonoide 2-fenilcromano. Presentan similitudes estructurales con los estrógenos. Aunque no son esteroides, tienen grupos hidroxilo en las posiciones 4' y 7 de la molécula, una configuración similar a la de los hidroxilos en la molécula de estradiol, lo que les confiere propiedades pseudohormonales y lleva a clasificarlas como fitoestrógenos.

Las isoflavonas tienen una distribución muy limitada en alimentos, encontrándose casi exclusivamente en leguminosas. La soja y sus productos procesados son la principal fuente de isoflavonas en la dieta humana, siendo las más comunes los glicósidos de genisteína y daidzeína (Figura II.10).

Isoflavonas	R ₅	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Genisteína	OH	H	OH	H
Daidzeína	H	H	OH	H

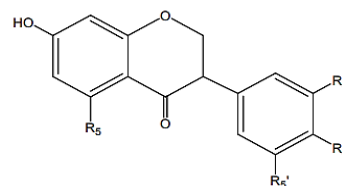
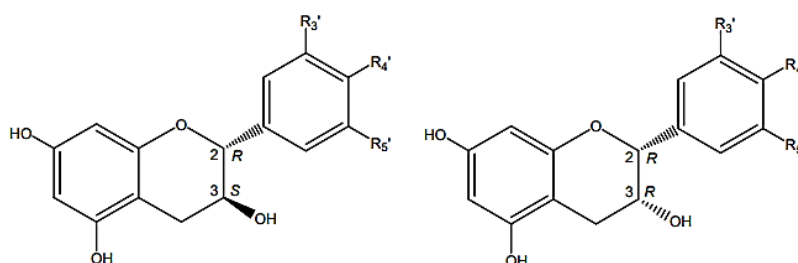


Figura II.10. Aglicones de isoflavonas más habituales en la soja y derivados.

e) Flavan-3-oles (catequinas y proantocianidinas)

Los compuestos de esta familia presentan un esqueleto básico en el que los dos anillos bencénicos están unidos por un heterociclo no aromático hidroxilado en posición 3. En la naturaleza, pueden encontrarse como monómeros, conocidos genéricamente como catequinas (Figura II.11), o condensados entre sí, formando estructuras con diferentes grados de polimerización, denominadas taninos condensados o proantocianidinas, que pueden clasificarse según el grado de polimerización como oligómeros (dímeros a tetrameros) o polímeros (cinco o más unidades) (Zhao et al. 2023).



Flavan-3-oles	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	C ₂	C ₃
(+)-Galocatequina	OH	OH	OH	R	S
(+)-Catequina	OH	OH	H	R	S
(-)-Epigalocatequina	OH	OH	OH	R	R
(-)-Epicatequina	OH	OH	H	R	R

Figura II.11. Estructura química de los principales flavan-3-oles monómeros en bayas

Los principales flavan-3-oles monómeros son epicatequina (EC), catequina (C), epigalocatequina (EGC) y galocatequina (GC), que se distinguen entre sí por la configuración de los carbonos asimétricos y el grado de hidroxilación de su anillo B. Además, la presencia de dos carbonos asimétricos (C2 y C3) resulta en cuatro isómeros ópticos para cada catequina. Entre ellos, los más comunes son los pares diastereoisoméricos (+)-galocatequina / (-)-epigalocatequina y (+)-catequina (2*R*, 3*S*; *trans*) / (-)-epicatequina (2*R*, 3*R*; *cis*) (Figura II.11) (De Pascual-Teresa, Moreno, y García-Viguera 2010).

(-)-Epicatequina y (+)-catequina, habitualmente referidas como epicatequina y catequina, son considerados los flavonoides más comunes en la dieta humana, junto con el flavonol quercetina. De hecho, estos compuestos son los principales flavan-3-oles presentes en frutas, mientras que galocatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina se encuentran en ciertas plantas leguminosas, en uvas y en té. A diferencia de otras clases de flavonoides, los flavan-3-oles no suelen encontrarse glicosilados en los alimentos (Santos-Buelga y Scalbert 2010).

En lo que respecta a las formas condensadas, las proantocianidinas formadas por unidades de (epi)catequina se denominan procianidinas, ya que por hidrólisis ácida dan lugar a la formación de cianidina. Existen también proantocianidinas menos comunes, como las propelargonidinas y prodelfinidinas, que contienen subunidades de (epi)afzelequina o (epi)galocatequina, respectivamente, así como proantocianidinas mixtas que presentan diferentes tipos de catequinas en su estructura. Las procianidinas, que tienen una sustitución 3',4'-dihidroxilo en el anillo B, son más prevalentes en los alimentos que las prodelfinidinas, presentes, por ejemplo, en uvas y vino tinto (Kuhnle 2018; Santos-Buelga y Scalbert 2010).

En frutos como las bayas se han identificado principalmente monómeros de flavan-3-ol, como (+)-catequina y (-)-epicatequina, así como dímeros, trímeros y proantocianidinas polímeras. Se presume que estos compuestos influyen en las propiedades organolépticas de las bayas, como astringencia, amargor, acidez y coloración (Jaganath y Crozier 2010). Generalmente, en las bayas, especialmente en los arándanos, la concentración de proantocianidinas altamente polimerizadas suele ser mayor que la de los monómeros, dímeros y trímeros. Aunque estos compuestos están aún mal caracterizados, debido a su difícil extracción y separación. En todo caso, los oligómeros parecen ser los principales responsables de muchas de las reacciones biológicas atribuidas a los taninos condensados, como su capacidad para formar enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con proteínas (responsable de la sensación de astringencia), así como su actividad antimicrobiana y antifúngica, y su potencial para actuar como inhibidores enzimáticos (Del Rio et al. 2013; Van de Velde et al. 2016).

f) Antocianos

El término antociano, proviene del griego *anthos*, que significa flor, y *kianos*, que significa azul. Constituyen el grupo más grande de pigmentos hidrosolubles en el reino vegetal y están presentes en una amplia gama de plantas vasculares, particularmente en frutos y flores, a los que confieren una variedad de colores que varían desde el naranja y el rojo hasta el azul y el morado. Sus diversas funciones en las plantas incluyen, atraer la polinización de los insectos y la dispersión de semillas por otros animales, mejorar el estrés abiótico y biológico, prevenir el daño de los rayos UV y participar en procesos fisiológicos (Santos-Buelga y González-Paramás 2018).

Dentro de los antocianos se puede diferenciar entre "antocianidinas", aglicones, y "antocianinas", sus derivados glicosilados. Su estructura básica deriva del esqueleto de flavilio (2-fenilbenzopirilio) que se hidroxila y metoxila de diversas formas, habiéndose identificado alrededor de 30 antocianidinas diferentes, de las cuales solo seis son prevalentes en la naturaleza: cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina, peonidina, y malvidina (Figura II.12). Las agliconas libres son bastante inestables, por lo que generalmente se encuentran en formas glicosiladas y aciladas en fuentes naturales (Álvarez-Suárez et al. 2021). La glucosa es el azúcar sustituyente más común, aunque otros monosacáridos, como, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa o ácido glucurónico, y di- o trisacáridos (neohesperidosa, rutinosa, xilosilrutinosa, sambubiosa y glucosilrutinosa), también se encuentran como restos glicosilo. Los azúcares pueden estar, a su vez, sustituidos por ácidos alifáticos o fenólicos, siendo los más habituales los ácidos cafeicos, *p*-cumárico, acético y malónico. Se ha estimado que más del 65 % de los antocianos naturales están aciladas, siendo el ácido malónico el grupo acilo más frecuente (Santos-Buelga y Gonzalez-Paramas 2018).

Para las seis antocianidinas más comunes, la estabilidad depende del patrón de sustitución en el anillo B: disminuye con el aumento de hidroxilos y aumenta con más metoxilos. Así, la pelargonidina es la antocianidina más estable, seguida por malvidina, peonidina, petunidina, cianidina y delphinidina. Además, la sustitución

en el anillo B influye en el color, intensificando el tono azul con un mayor número de sustituyentes (Álvarez-Suárez et al. 2021).

Antocianidinas	R_{3'}	R_{4'}	R_{5'}
Perlargonidina	H	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH
Cianidina	OH	OH	H
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃
Peonidina	OCH ₃	OH	H
Petunidina	OCH ₃	OH	OH

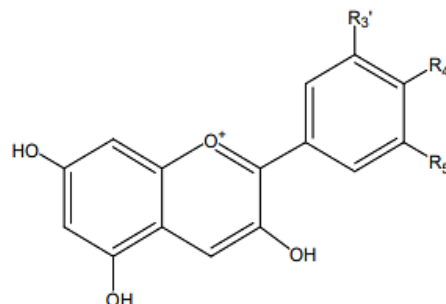


Figura II.12. Estructura química de las principales antocianidinas

Los antocianos se distribuyen ampliamente en la dieta humana a través de frutas, verduras y alimentos y bebidas de origen vegetal. Se encuentran sobre todo en frutas como las bayas, las cuales deben sus colores característicos a estos compuestos, y en menor medida en cereales y verduras (Santos-Buelga y González-Paramás 2018). Entre las bayas, en la familia de las rosáceas (moras, fresas, frambuesas, cerezas y ciruelas) destacan principalmente los derivados de cianidina. Sin embargo, otras antocianos derivadas de delfinidina, perlargonidina, petunidina, peonidina, y malvidina también están presentes en diversas especies de bayas. El contenido de antocianos en las frutas suele ser proporcional a la intensidad del color, variando desde unos pocos miligramos hasta más de 1000 mg por cada 100 g de peso fresco, con niveles más altos en algunas bayas consumidas comúnmente como grosellas negras, moras, arándanos y aronia (Neves et al. 2022). La ingesta de antocianos varía considerablemente según el país, la estación y los hábitos alimentarios, particularmente en relación con el consumo de frutas, bayas y vino tinto. (Kühnau (1976) estimó inicialmente la ingesta promedio de antocianos en los Estados Unidos en el rango de 180 a 215 mg/día, aunque estudios posteriores en distintos grupos de población han reportado consumos diarios en general más bajos (Santos-Buelga y González-Paramás 2018).

Además de influir en la coloración de las plantas, los antocianos se han destacado por sus beneficios para la salud humana. En los últimos tiempos, la investigación sobre estos compuestos ha crecido significativamente, acumulando evidencia sobre sus propiedades beneficiosas. Estudios *in vivo* e *in vitro* han evaluado y determinado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, hipolipemiantes anticancerígenas, hepatoprotectoras y neuroprotectoras en estos compuestos (Cheng et al. 2023; Li y Ahammed 2023). Debido a estos efectos promotores de la salud, también se ha propuesto el uso de antocianos como nutraceuticos, en la formulación de alimentos funcionales o suplementos dietéticos, convirtiéndolos en componentes alimentarios multifuncionales (Álvarez-Suárez et al. 2021; Foroutani et al. 2024)

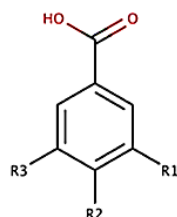
2.3.2.2 Compuestos fenólicos no flavonoides

a) Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos, también conocidos como fenolcarboxílicos, son una de las clases principales de compuestos fenólicos sintetizados por las plantas. En la naturaleza se encuentran formando ésteres o glucósidos, unidos a amidas y, en algunos casos, en forma libre. Además, estos compuestos, están involucrados en mecanismos de defensa contra el estrés biótico y abiótico y utilizan a la fenilalanina como sustrato para su biosíntesis a través de la vía de los fenilpropanoides (Santos-Buelga, González-Paramás, y González-Manzano 2023).

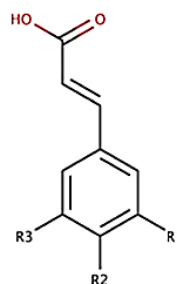
Los ácidos fenólicos se caracterizan estructuralmente por poseer un anillo aromático y un grupo carboxilo y en los alimentos se encuentran principalmente en dos subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos poseen una estructura común C_6-C_1 y derivan del ácido benzoico, mientras que los ácidos hidroxicinámicos poseen una estructura común C_3-C_6 y derivan del ácido cinámico (Figura II.13). Ambos subgrupos se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y se encuentran en una gran variedad de plantas medicinales, verduras y frutas, como frambuesas, uvas, moras, fresas, arándanos y grosellas negras (Bento-Silva et al. 2019).

ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS



1. R1= R2= R3= H, Ácido benzoico
2. R1= R2= R3= OH, Ácido gálico
3. R1= R2= OH, R3= H, Ácido protocatecuico
4. R1= R3= H, R2= OH, Ácido *p*-hidroxibenzoico
5. R1= OCH₃, R2= OH, R3= H, Ácido vanílico

ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS



6. R1= R2= R3= H, Ácido cinámico
7. R1= R2= OH, R3= H, Ácido cafeico
8. R1= R3= H, R2= OH, Ácido *p*-cumárico
9. R1= OCH₃, R2= OH, R3= H, Ácido ferúlico
10. R1= R3= OCH₃, R2= OH, Ácido sinápico

Figura II.13. Estructura general de ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos.

Fuente: (Bento-Silva et al. 2019)

Los ácidos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las bayas de las familias Ericaceae, Grossulariaceae, Rosaceae y Saxifragaceae. Entre los derivados hidroxibenzoicos presentes las bayas se incluyen los ácidos *p*-hidroxibenzoico, salicílico, gálico y eláxico (Schulz y Chim 2019). En bayas como la aronia (*Aronia* spp., *chokeberry*) destacan principalmente los derivados hidroxicinámicos, como ácido cafeico y ácido clorogénico (ácido cafeoilquínico), reportándose concentraciones de 301,85 mg/100 g y 290,81 mg/100 g de peso seco, respectivamente (Vendrame et al. 2024). En las fresas, el ácido eláxico es el ácido predominante, representando el 51 % de todos los ácidos presentes en esta fruta, con un contenido total que oscila entre 25,01 y 56,35 mg/100 g de peso fresco (da Silva-Pinto, Lajolo, y Genovese 2008). El ácido eláxico y sus derivados los elagitaninos constituyen el segundo grupo más importante de compuestos fenólicos en la fresa tras los antocianos y son también abundantes en todos los tipos de bayas, alcanzando concentraciones especialmente elevadas en especies del género *Rubus*, como la frambuesa (Koponen et al. 2007). Por otro lado, los arándanos y las moras contienen cantidades significativas de ácido ferúlico y *p*-cumárico, mientras que la grosella negra se distingue por su alto contenido de ácido cafeico (Jiménez-García et al. 2013; Saibabu et al. 2015) Se han descrito diversas actividades biológicas para esta clase de compuestos

fenólicos, incluyendo antibacterianas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Gramza-Michałowska, Sidor, y Kulczyński 2017; Vendrame et al. 2024).

b) Estilbenos

Los estilbenos tienen una estructura C6-C2-C6 y actúan como fitoalexinas, producidas por las plantas en respuesta a enfermedades, lesiones y estrés. El principal representante de este grupo es el resveratrol, que puede presentarse en forma de isómeros *cis* y *trans*, así como en varios derivados conjugados. La raíz leñosa de *Polygonum cuspidatum* contiene niveles inusualmente altos de *trans*-resveratrol y su glucósido (piceido), con concentraciones de hasta 3,77 mg/g de peso seco (Del Rio et al. 2013). Sin embargo, estos compuestos están poco representados en la dieta humana, siendo sus fuentes más significativas uvas, mostos, vino tinto y cacahuetes (Cassidy, Hanley y Lamuela-Raventos 2000). En el vino tinto, se han descrito contenidos de 0,3 a 7 mg de *trans*-resveratrol/L y hasta 15 mg de sus glucósidos/L (Manach et al. 2004a).

c) Lignanos

La estructura básica de los lignanos es (C6-C2)₂. La linaza es la fuente dietética más rica en estos compuestos, conteniendo mayoritariamente secoisolariciresinol y pequeñas cantidades de matairesinol (Manach et al. 2004a). Menores concentraciones de lignanos también se encuentran en otras semillas oleaginosas como la soja y lentejas, salvado de cereales, algas y algunas hortalizas tales como espárragos, zanahoria, ajo y brócoli (Cassidy, Hanley y Lamuela-Raventos 2000). En el organismo humano, los lignanos vegetales son metabolizados por la microbiota intestinal a enterolignanos (enterodiol y enterolactona), los cuales se asocian con los efectos beneficiosos para la salud derivados de su consumo (Adlercreutz 2007).

d) Alcoholes fenólicos

Los alcoholes fenólicos (C6-C2), como tirosol e hidroxitirosol, y sus derivados, como los ésteres con ácido elenoico (por ejemplo, oleuropeína), se encuentran principalmente en las aceitunas y el aceite de oliva. Los niveles de compuestos fenólicos tanto en aceitunas como en aceite de oliva varían ampliamente

dependiendo del origen, cultivar y método de procesado. Su contenido puede alcanzar varios gramos por kilogramo en la aceituna no procesada, pero se reduce considerablemente durante el tratamiento para la obtención de aceitunas de mesa y la producción del aceite de oliva, por el sabor amargo que imparten (Romero et al. 2001). En aceitunas de mesa se han descrito concentraciones de polifenoles totales de hasta 1200 mg/Kg, siendo tirosol e hidroxitirosol los compuestos más abundantes (Romero et al. 2004). En aceites de oliva virgen españoles de diferentes variedades se determinaron contenidos de tirosol + hidroxitirosol entre 100 y 400 mg/Kg aceite (Romero y Brenes 2012).

2.3.3 Factores que influyen en la acumulación de compuestos fenólicos en las plantas

Aunque, en principio, las plantas poseen una composición fenólica característica ligada a la especie, ésta se ve influida por factores bióticos y abióticos, como condiciones ambientales y agronómicas, que determinan la acumulación de estos compuestos y pueden alterar el perfil fenólico. La variabilidad genética desempeña, asimismo, un papel crucial, ya que las interacciones genético-ambientales pueden dar lugar a una gran fluctuación en el contenido fenólico entre especies e incluso cultivares de la misma especie (Ghorbanpour y Varma 2017). Variables externas como la luz, la disponibilidad de agua y nutrientes, la humedad, la salinidad del suelo, la temperatura, la altitud, la época de cosecha, el grado de madurez y el origen geográfico son causa de estrés ambiental que influye significativamente en la respuesta de las plantas. Así, la producción diferenciada de metabolitos secundarios puede interpretarse como un comportamiento adaptativo de la planta para su supervivencia (Yang et al. 2018, Akhatou y Fernández-Recamales 2014). Generalmente, bajo condiciones de estrés, las plantas tienden a incrementar su actividad enzimática, lo que fomenta la síntesis de compuestos del metabolismo secundario. Esta acumulación se atribuye al aumento en la actividad de enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la calcona sintasa (CHS), fundamentales en la síntesis de flavonoides, cuya actividad puede verse afectada por el estrés ambiental. La PAL, en particular, es la principal enzima relacionada con la defensa

de las plantas, ya que se encuentra al comienzo de la ruta de síntesis de compuestos fenólicos y ligninas (Ghorbanpour y Varma 2017).

Se presume que la composición química y las capacidades biológicas de los frutos, como las bayas, dependen significativamente del régimen térmico y de la altitud de la zona de producción. Estas variables determinan el microclima en el que se desarrollan las plantas, influyendo directamente en la maduración y las características organolépticas y nutricionales de los frutos (Guevara-Terán et al. 2022). Existen diversas tendencias climáticas típicamente vinculadas con la altitud. Por ejemplo, a mayor altitud, las temperaturas tienden a disminuir y la intensidad de la radiación UV aumenta. Estos cambios pueden estimular respuestas metabólicas en las plantas, llevando a la producción de compuestos fenólicos (Guerrero-Chavez, Scampicchio y Andreotti 2015). Estudios en especies de bayas como *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium corymbosum* L determinaron que la biosíntesis de flavonoides como quercetina, rutina y luteolina aumentaba cuando la especie crecía altitudes a elevadas, pero no la de flavonoides como kaempferol y apigenina, que disminuía (Burdulis et al. 2009). Esto coincide con los resultados obtenidos en frambuesas rojas cultivadas en Finlandia, donde se observó que la concentración de quercetina era notablemente menor a altitudes más bajas (Makris y Rossiter 2001). Por otro lado, en bayas del género *Rubus*, como *Rubus fruticosus* y *Rubus idaeus*, se encontró una alta concentración de ácido elágico y quercetina, respectivamente, en relación con otros componentes fenólicos a medida que aumenta la altitud. Estos estudios indicaron que los factores ambientales, de desarrollo, fenotípicos y genéticos tienen un efecto significativo sobre el contenido de estos compuestos (S. Wang y Hsin-Shan 2010).

La altitud puede tener un impacto significativo en la evolución del estado de madurez del fruto, al influir sobre factores como la temperatura, la radiación solar y la presión atmosférica (Fischer, Parra-Coronado y Balaguera-López 2022). Se ha demostrado que la acción combinada de estas variables afecta al desarrollo del fruto y a su perfil fenólico. Las temperaturas más bajas en altitudes más altas ralentizan el proceso de maduración y la radiación solar, la presión atmosférica y las condiciones climáticas cambiantes influyen sobre el sabor y la calidad global

(Guevara-Terán et al. 2022). Es importante señalar que los flavonoides, carotenoides y clorofilas son los compuestos predominantes en las bayas durante la fase inicial de maduración, cuando su color cambia de verde a rosa. Durante la maduración, las clorofilas se descomponen y la concentración de flavonoles y carotenoides disminuye, al mismo tiempo que aumenta el contenido de antocianos, convirtiéndose en los principales flavonoides en las bayas maduras (Spinardi et al. 2019). En un estudio en *Vaccinium corymbosum* L se determinó que la concentración de antocianos aumentaba 34 veces durante la maduración en altitudes más altas, mientras que en altitudes bajas la concentración solo lo hacía 25 veces (Zoratti et al. 2015).

Evidentemente, la producción de compuestos fenólicos inducida por factores de estrés varía entre las diferentes especies, constituyendo un importante objeto de estudio. No obstante, las plantas pueden adaptarse a su entorno mediante diversos mecanismos bioquímicos y genéticos, lo que es beneficioso tanto para su supervivencia como para la síntesis de moléculas potencialmente bioactivas (Borges et al. 2017).

2.3.4 Actividad y disponibilidad de los compuestos fenólicos

2.3.4.1 Estudios epidemiológicos

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en polifenoles está asociada con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, algunos tipos de cáncer, diabetes tipo II o dolencias cardiovasculares. Sin embargo, las evidencias aportadas por este tipo de estudios son insuficientes para hacer afirmaciones indiscutibles sobre los efectos positivos del consumo de polifenoles para la salud. Existen muchos factores de confusión, que pueden distorsionar los resultados y que no siempre son suficientemente considerados, y algunos estudios carecen de controles rigurosos, lo que puede llevar a sesgos y resultados no concluyentes. Además, los resultados no siempre son aplicables a la población general, ya que las muestras estudiadas no suelen representar adecuadamente la diversidad genética y ambiental (Buijsse et al.

2015; Dai et al. 2006; Oh et al. 2017; Vitale et al. 2017; Yuan, Sun y Butler 2011; Zamora-Ros et al. 2013).

Por lo tanto, es necesario realizar más estudios bien controlados y monitorizados, utilizando marcadores adecuados para determinar la implicación de estos compuestos en la salud. Los estudios epidemiológicos deben, además, complementarse con ensayos en animales, evaluaciones de mecanismos en modelos *in vitro* y, especialmente, con ensayos clínicos bien diseñados en voluntarios humanos sanos y con factores de riesgo, que puedan proporcionar evidencias más sólidas sobre la eficacia y seguridad de los polifenoles. Aunque se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la bioactividad de los compuestos fenólicos, aún hay limitaciones y debates sobre los mecanismos responsables de su actividad *in vivo* (Del Rio et al. 2013; Zamora-Ros et al. 2013)

2.3.4.2 Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos

Los beneficios de los polifenoles para la salud, en general, están determinados tanto por la cantidad ingerida como por su biodisponibilidad. Calcular con precisión la ingesta dietética de polifenoles en alimentos y bebidas es un desafío debido a su amplia diversidad estructural, lo que complica su análisis. Además, obtener este tipo de información se vuelve aún más complicado debido a las disparidades en los métodos de análisis utilizados por diferentes investigadores, que no siempre son estandarizados. A esto se suma la variabilidad en la composición de un mismo alimento, influenciada por factores como las diferentes variedades y las condiciones agroclimáticas, modificando de esta manera su perfil fenólico, así como el procesado y la preparación culinaria.

En 1976, Kühnau fue pionero al estimar la ingesta humana de flavonoides, sugiriendo un consumo diario medio de alrededor de 1 g, aunque estimaciones más recientes sitúan esta cantidad por debajo de dicho nivel. Los monómeros de flavan-3-ol (catequinas) y sus formas poliméricas (proantocianidinas) son probablemente los flavonoides más habituales en las dietas occidentales, seguidos de los antocianos y los flavonoles (Jaganath y Crozier 2010). Para los flavan-3-ol monómeros se han calculado ingestas medias para la población

europea de 53 mg/día de derivados galoilados y 24 mg/día de no galoilados, aunque los más consumidos son las formas complejas, como las teaflavinas y tearubiginas (168 mg/día) presentes en el té, y las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas (124 mg/día), que se encuentran principalmente en frutas (Vogiatzoglou et al. 2015).

Los antocianos son pigmentos abundantes en bayas, que pueden alcanzar valores de hasta 2-6 g/Kg de peso fresco en grosellas negras, moras o uvas tintas. Su ingesta promedio en adultos en países occidentales varía según el país, la temporada y los hábitos alimenticios, especialmente en relación con el consumo de bayas y vino tinto, con medias estimadas de alrededor de 10 mg/día, 12,5 mg/día en Estados Unidos y hasta 82,5 mg/día en Finlandia, donde el consumo de bayas es elevado (Santos-Buelga y González-Paramás 2019).

Los glucósidos de quercetina son los flavonoles más comunes en la dieta, aunque también están bien representados los derivados de kaempferol, miricetina e isoramnetina. Estos compuestos se encuentran en frutas como la manzana y bayas, así como en verduras, con concentraciones particularmente altas de quercetina en las cebollas (entre 200-1000 µg/g peso fresco). Otros grupos de flavonoides, como las flavonas y las isoflavonas, tienen una distribución más limitada en los alimentos (Santos-Buelga y González-Paramás 2016).

La biodisponibilidad puede definirse como "la tasa y el grado en que un ingrediente o una fracción activa se absorbe desde una matriz y llega a estar disponible en el sitio de acción". Basándose en esta definición, los parámetros más importantes para que un compuesto fenólico sea efectivo en un sistema biológico son la tasa de absorción y la disponibilidad en el sitio de acción (González-Paramás et al. 2018). La biodisponibilidad de los polifenoles en la dieta dentro del tracto digestivo exhibe una notable variabilidad, estando principalmente influenciada por su estructura química y la presencia de grupos funcionales, más que por su concentración en los alimentos. A pesar de su prevalencia en la dieta, los polifenoles podrían no ser los compuestos biológicamente más activos en el organismo debido a su limitada absorción, así

como a su rápida metabolización y excreción (Lavefve, Howard y Carbonero 2020).

En los alimentos, la mayoría de los compuestos fenólicos están presentes en forma de glicósidos, aunque también pueden encontrarse esterificados o como polímeros. Al ser ingeridos, el cuerpo humano los reconoce como xenobióticos y su biodisponibilidad es relativamente baja en comparación con micro y macronutrientes. Dependiendo de su estructura, se estima que solo entre el 5 % y el 10 % de los polifenoles consumidos son absorbidos en el intestino delgado (Clifford 2004). Por otro lado, en el intestino grueso, la microbiota juega un papel crucial al transformar significativamente los compuestos fenólicos en metabolitos de bajo peso molecular (Cardona et al. 2013). Se calcula que entre el 90 % y el 95 % de los polifenoles alcanzan el colon, donde son convertidos por la microbiota en metabolitos biodisponibles, que pueden ser incluso más bioactivos que los compuestos originales (Kroon et al. 2004).

2.3.4.2.1 Absorción

Generalmente, los polifenoles se encuentran en alimentos en formas de éster, glicósidos o polímeros, los cuales necesitan ser hidrolizados para su absorción, ya sea por enzimas intestinales o por la microbiota intestinal. Se ha observado que la hidrólisis puede ocurrir en la cavidad oral, gracias a la acción de la β -glucosidasa presente en la saliva o producida por la microbiota oral, aunque no está clara la extensión e importancia de este proceso para la biodisponibilidad de los polifenoles (Day et al. 2000; Lavefve, Howard y Carbonero 2020; Requena et al. 2010). El proceso principal ocurre en el intestino delgado, donde la enzima lactasa florizin hidrolasa (LPH), presente en el epitelio intestinal, separa los restos glicosilados de algunas moléculas flavonoides y libera agliconas, como en el caso del quercetina-3-*O*-glucósido. Estas agliconas pueden penetrar en la célula intestinal mediante difusión pasiva debido a su mayor lipofilicidad. Una vez dentro del enterocito, experimentan transformaciones de fase I (oxidación, reducción o hidrólisis) y fase II (glucuronidación, sulfatación, metilación) antes de pasar a circulación sistémica y alcanzar el hígado. Por otro lado, la enzima β -glucosidasa citosólica (CBG), ubicada dentro de los enterocitos,

es también responsable de la hidrólisis de los glicósidos. Sin embargo, para que esto ocurra, los glicósidos deben pasar previamente al interior de las células mediante transporte activo. Se ha observado que algunos flavonoides, como quercetina-4'-*O*-glucósido, pueden ser transportados por el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) (Day et al. 2000; Németh et al. 2003; Walgren et al. 2000). Es importante destacar que las β -glucosidasas no actúan sobre los glicósidos de flavonoides que no son monoglucósidos, como el hiperósido (quercetina-3-*O*-galactósido) o la rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido). Estos glicósidos llegan intactos al intestino grueso, donde pueden ser hidrolizados por la microbiota intestinal, liberando aglicones que pueden ser absorbidos en el intestino grueso o degradados en productos más simples (Arts et al. 2004; Erlund et al. 2000). A diferencia de otros flavonoides, los flavan-3-oles no suelen estar glicosilados en los alimentos, aunque a menudo se encuentran acilados con ácido gálico. Algunos monómeros de flavan-3-oles (aproximadamente 8-17 %) pueden ser absorbidos en los enterocitos del intestino delgado sin necesidad de hidrólisis previa (Santhakumar, Battino y Alvarez-Suarez 2018). No obstante, la mayoría de los flavan-3-oles llegan inalterados al intestino grueso, donde son metabolizados por la flora colónica, produciendo diversos metabolitos de bajo peso molecular, como ácidos, aldehídos fenólicos y derivados como las valerolactonas. Los metabolitos derivados de la degradación de flavonoides por la microbiota intestinal pueden ser absorbidos en el intestino grueso y contribuir parcialmente a los efectos biológicos y antioxidantes de una dieta rica en estos polifenoles (Espín, García-Conesa y Tomás-Barberán 2007; Marín et al. 2015).

En el caso de los antocianos, presentes en una variedad de alimentos que incluye las bayas, al ser compuestos altamente polares presentan desafíos en cuanto a su absorción por las células humanas. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que estas sustancias pueden ser absorbidas y metabolizadas en diferentes puntos a lo largo del tracto gastrointestinal. Similar a lo comentado para el resto de flavonoides, el proceso digestivo comienza en la cavidad oral, donde los antocianos entran en contacto con la saliva humana y la microbiota oral, que secretan enzimas con actividad β -glucosidasa (Requena et al. 2010b),

lo que produce una degradación parcial. Aunque la permanencia de los antocianos en la cavidad oral es breve, este proceso inicial de digestión proporciona el primer paso hacia su metabolismo. Se han descrito porcentajes de degradación oral de antocianos de diversas bayas muy amplios, entre el 8 y el 90 %, con un promedio en torno al 10 % en 5 minutos (Xue et al. 2023). El estómago juega un papel en la absorción inicial de los antocianos, existiendo evidencias de que algunos de ellos pueden ser absorbidos en cierto porcentaje en este compartimento, con una tasa de absorción que puede alcanzar hasta el 20 % (McGhie et al. 2003). Este proceso de absorción puede depender de enzimas específicas presentes en los tejidos gástricos (uridina difosfato glucuronosiltransferasa y la sulfotransferasa). Además, la absorción y transformación de los antocianos en el estómago depende de las enzimas de translocación de bilirrubina, ya que tomando sus aniones orgánicos como transportadores, ingresan al sistema circulatorio a través del hígado y se transfieren al intestino con la bilis después del metabolismo (Passamonti et al. 2009). Los antocianos no absorbidos por el tejido estomacal ingresan al intestino delgado, donde, en condiciones neutras y ligeramente ácidas, tienden a formar bases quinónicas, pseudobases y calconas que son inestables y vulnerables al ataque nucleofílico del agua. Al igual que otros flavonoides, una pequeña fracción de antocianos puede ser captada en el intestino delgado y sufrir procesos de conjugación de fase II, tanto en el enterocito como posteriormente en hígado. Igualmente, la fracción no absorbida alcanza el colon y se ve sometida a la acción de la microbiota, dando lugar a la formación de ácidos fenólicos de bajo peso molecular, aldehídos y otros metabolitos, que pueden ser absorbido y contribuir a los efectos de los antocianos en el organismo. En conjunto, el proceso de digestión y absorción de estos pigmentos en el tracto gastrointestinal es complejo y altamente regulado, pero es fundamental para su capacidad de ejercer efectos beneficiosos en el organismo humano (Xue et al. 2023).

Se ha indicado que los polifenoles mejor absorbidos en humanos son las isoflavonas y el ácido gálico, seguidos por las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina. Por otro lado, los antocianos y las proantocianidinas oligoméricas

tienen una absorción deficiente, y es poco probable que se absorban sin degradarse previamente en compuestos de menor peso molecular (Manach et al. 2004b). De manera similar, los ácidos hidroxicinámicos suelen estar esterificados con azúcares, ácidos orgánicos y lípidos, y no existen esterasas humanas capaces de romper estos enlaces éster, lo que complica su absorción (Marín et al. 2014).

2.3.4.2 Metabolismo

Una vez captados por el intestino delgado, los compuestos fenólicos interactúan con enzimas de fase II, como uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs), catecol-O-metiltransferasas (COMT) y sulfotransferasas (SULT), tanto en los enterocitos como posteriormente en el hígado y los tejidos periféricos (Donovan et al. 2007). Como resultado de esta interacción, estos compuestos se metabolizan ampliamente antes de ingresar a la circulación sistémica. Además, se ha observado la formación de conjugados con glutatión para inactivar productos intermedios potencialmente nocivos. Esto es particularmente importante para flavonoides como quercetina, que poseen un grupo catecol sensible a procesos de oxidación, lo que puede dar lugar a quinonas reactivas capaces de causar daño oxidativo en las células (Hong y Mitchell 2006). Después de ser conjugados en el intestino, los compuestos fenólicos son transportados al hígado a través de la vena porta o los capilares linfáticos de las microvellosidades (lacteales). En el hígado, se lleva a cabo una importante fase de metabolismo II, sufriendo procesos adicionales de conjugación, como sulfatación y metilación, antes de que los compuestos fenólicos se distribuyan a tejidos periféricos a través de la circulación sistémica (Murota, Nakamura y Uehara 2018). Parte de los metabolitos pueden entrar también en circulación enterohepática y volver al intestino a través de la bilis. Se presume que, aunque la metilación y la glucuronidación ocurren tanto en las células intestinales como en el hígado, la sulfatación se produce principalmente en el hígado (Rechner et al. 2002).

Como se ha señalado, los compuestos fenólicos no absorbidos en el intestino delgado y sus formas conjugadas, que llegan al intestino a través de la bilis, alcanzan el colon. Allí, son transformados por enzimas microbianas que catalizan diversas reacciones, como, desmetilación, deshidroxilación, descarboxilación, ruptura de anillos e hidrólisis de glucurónidos, sulfatos y glicósidos lo que lleva a la formación de diferentes moléculas de bajo peso molecular. Estos metabolitos pueden ser absorbidos y sufrir igualmente reacciones de conjugación de fase II, en células intestinales e hígado (Aura 2008; Stevens y Maier 2016). De este modo, los compuestos fenólicos se van a encontrar fundamentalmente en plasma en forma de metabolitos conjugados, como glucurónidos, sulfatos y derivados metilados que serán distribuidos a células y tejidos específicos y eliminados a través de la orina o las heces (Rodríguez-Mateos et al. 2014).

Aunque se sabe poco sobre cómo se distribuyen exactamente los compuestos fenólicos y cuáles son sus tejidos diana, se ha observado que las concentraciones de estos compuestos en plasma y tejidos específicos son muy bajas después de un proceso metabólico extenso, situándose en niveles de rango nanomolar (nM) a micromolar (μM) en unas pocas horas para posteriormente casi desaparecer a las 24 h (Kawabata et al. 2013; Rodríguez-Mateos et al. 2014) Este bajo nivel de concentración sugiere que estos compuestos podrían estar involucrados únicamente en procesos biológicos altamente específicos (Fraga et al. 2010).

2.3.4.2.3 Transformación de los compuestos fenólicos por la microbiota intestinal

Las interacciones entre tracto buco-gastrointestinal, polifenoles y microbiota son un área de estudio en crecimiento. Este sistema complejo del cuerpo humano alberga una amplia variedad de bacterias en cada una de sus secciones. Actualmente, se han identificado más de 1000 especies bacterianas en este sistema, siendo las bacterias anaerobias las más comunes (Williamson y Clifford 2010). Comenzando por la boca, la saliva contiene alrededor de 10^8 a 10^9

bacterias/mL, mientras que la placa dental posee aproximadamente 10^{11} bacterias/g (Dueñas et al., 2015). Las especies más comunes pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces* y *Prevotella*, entre otros. La composición varía según la higiene oral, la dieta y otros factores ambientales. Tradicionalmente se creía que el esófago era estéril debido a su ambiente ácido, sin embargo, estudios recientes han revelado la presencia de una microbiota esofágica. Esta microbiota, aunque es menos diversa que la oral, está dominada principalmente por especies como *Streptococcus* y *Prevotella*. En el estómago, el entorno altamente ácido limita el crecimiento bacteriano, pero algunas especies como *Helicobacter pylori* han evolucionado para sobrevivir y prosperar en este ambiente. La microbiota gástrica puede influir significativamente en la digestión, la absorción de nutrientes y la salud general del tracto gastrointestinal. Por otro lado, el intestino delgado alberga una microbiota menos estudiada pero igualmente importante para la absorción de nutrientes. Aquí se encuentran bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y algunas cepas de *Escherichia coli* (Dueñas et al., 2015).

El intestino grueso o colon es la región más poblada de microorganismos en el tracto gastrointestinal, con una estimación de 10^{11} a 10^{12} bacterias/g de heces. Aquí predominan bacterias anaerobias de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (incluidos los géneros *Clostridium* y *Ruminococcus*) y algunas especies de *Proteobacteria*. Esta microbiota desempeña roles fundamentales gracias a una gran variedad de actividades metabólicas y enzimáticas que repercuten en la nutrición y sistema inmunológico del huésped (Hervert-Hernández y Goñi 2011). Entre sus actividades enzimáticas se incluyen la capacidad de hidrolizar glucurónidos, glucósidos, amidas, sulfatos, ésteres y lactonas mediante enzimas como β -glucosidasas, β -glucuronidasa, α -ramnosidasas, esterases y sulfatasas. Además, las bacterias intestinales catalizan otras reacciones, como la escisión del anillo aromático o procesos de descarboxilación (descarboxilasas), reducción (reductasas, hidrogenasas), isomerización (isomerasas), desmetilación (desmetilasas) o deshidroxilación (deshidroxilasas) (Aura 2008). En todo caso, es importante mencionar que solo unas pocas especies bacterianas, como

Escherichia coli, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacteroides* sp. o *Eubacterium* sp., son capaces de catalizar el metabolismo de los compuestos fenólicos (Cardona et al., 2013).

La metabolización de compuestos fenólicos por la microbiota intestinal es un proceso altamente complejo que resulta en la generación de múltiples catabolitos. Estos catabolitos comprenden ácidos aromáticos y fenólicos con hasta tres hidroxilos aromáticos, así como derivados que pueden estar mono- o di-metoxilados y con cadenas laterales variables de uno a cinco carbonos, a veces con un grupo hidroxilo adicional en posiciones alifáticas (Manach et al. 2004b). En la Tabla II.2 se presenta una relación detallada de los principales metabolitos microbianos identificados derivados de los compuestos fenólicos y las bacterias involucradas en su transformación.

Según Williamson y Clifford (2017), los flavonoles como quercetina y kaempferol son principalmente metabolizados a ácidos fenilacéticos. Estos ácidos derivan de la degradación de los anillos flavonoides y representan un paso intermedio en la transformación de los flavonoles por la microbiota intestinal. En contraste, las flavonas y flavanonas, como naringenina y hesperetina, son convertidas en ácidos cinámicos y fenilpropiónicos durante su metabolización en el intestino. Estos ácidos son productos finales de la degradación de las estructuras flavonoideas y varían dependiendo de la estructura específica del flavonoide original. Por otro lado, los flavan-3-oles, como las catequinas encontradas en el té y ciertas bayas, experimentan principalmente una transformación en fenilvalerolactonas y ácidos fenilpropiónicos. Estos productos catabólicos continúan descomponiéndose hasta convertirse en ácidos benzoicos y sus derivados finales, que constituyen metabolitos comunes y finales de la vía de degradación de los flavan-3-oles por parte de la microbiota intestinal. Los antocianos, son predominantemente degradados a derivados del ácido benzoico, incluyendo ácido protocatéquico y otros relacionados (Figura II.14).

Tabla II.6. Metabolitos principales derivados de flavonoides y bacterias identificadas responsables de su transformación.

Fuentes: (Marín et al. 2014; Peirotén, Bravo, y Landete 2020; Romo-Vaquero et al. 2015)

Precusores	Principales metabolitos	Bacterias
Flavanonas	Ácidos cinámicos Ácidos fenilpropiónicos	<i>Eubacterium ramulus</i> <i>Clostridium</i> spp.
Flavonoles	Ácido protocatéquico Ácidos fenilacéticos Ácidos fenilpropiónicos	<i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Eubacterium oxidoreducens</i> <i>Clostridium orbiscidens</i> <i>Eubacterium ramulus</i>
Flavonas	Ácidos cinámicos Ácidos fenilpropiónicos	<i>Enterococcus avium</i> <i>Clostridium orbiscidens</i>
Flavan-3-oles	Ácidos fenilpropiónicos Ácidos fenilacéticos Fenilvalerolactonas Ácidos fenilvaléricos Ácidos benzoicos	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Clostridium coccoides</i>
Isoflavonas	(S)-Equol 6'-Hidroxi- <i>O</i> -desmetilangolensina <i>O</i> -Desmetilangolensina	<i>Lactobacillus mucosae</i> <i>Fingoldia magna</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Ruminococcus productus</i> <i>Eggerthella</i> sp. <i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium</i> spp.
Antocianos	Ácido vanílico Ácido propiónico Ácido protocatéquico Ácido siringico Pirogalol Catecol	<i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Ácidos hidroxicinámicos	Vainillinaldehído Ácidos fenilpropiónicos Ácidos benzoicos	<i>Escherichia coli</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>
Lignanos	Enterolactona Enterodiol	<i>Ruminococcus</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Eggertella lenta</i>
Ácido elágico y elagitaninos	Urolitinas	<i>Akkermansia muciniphila</i> <i>Gordonibacter</i> spp.

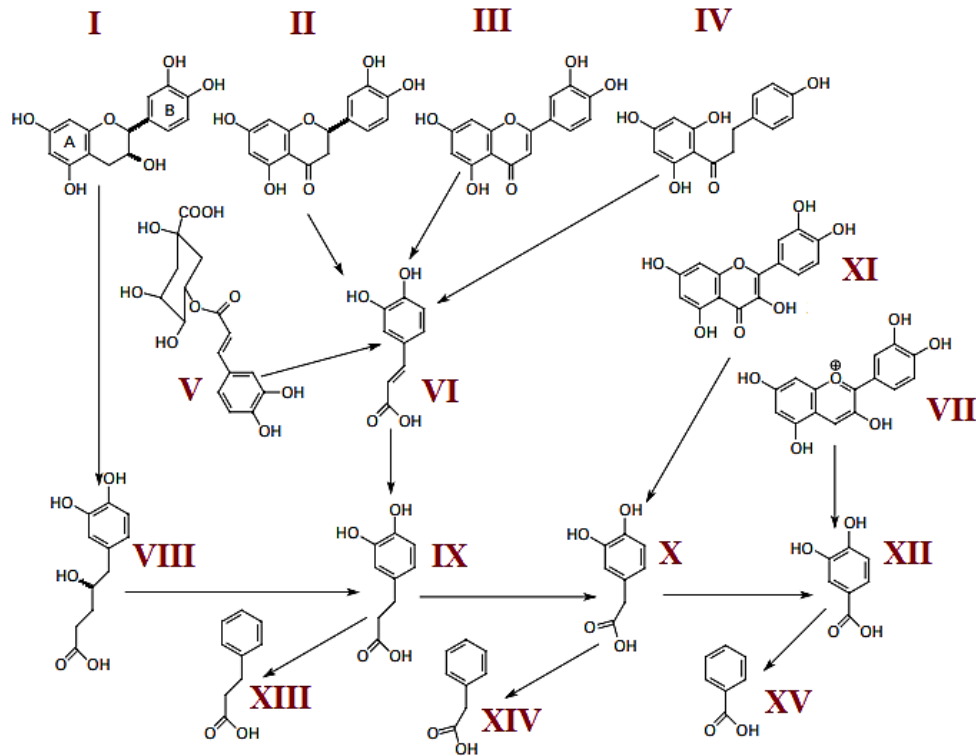


Figura II.14. Estructuras de polifenoles y sus metabolitos catabólicos producidos por la microbiota intestinal. Se muestran estructuras típicas para flavan-3-oles (catequinas) (I); flavanonas (II); flavonas (III); dihidrochalconas (IV); ácidos clorogénicos (conjugados de cinamato) (V); ácidos cinámicos (C6–C3) (VI); antocianos (VII); ácidos fenilvaléricos (C6–C5- γ -OH) (VIII); ácidos fenilpropiónicos (C6–C3) (IX, XIII); ácidos fenilacéticos (C6–C2) (X, XIV); flavonoles (XI); ácidos benzoicos (C6–C1) (XII, XV).
Fuente: Modificado de (Williamson y Clifford 2010).

En estudios *in vivo* en humanos y en experimentos de fermentación *in vitro* con microbiota intestinal, se ha observado, además, que ciertos ácidos fenólicos C6-C1, y posiblemente C6-C2, pueden experimentar una descarboxilación adicional, produciendo así fenoles o metilfenoles simples. Además, se han identificado algunos catabolitos, como los ácidos mandélico y fenilhidracrílico, cuyo origen sigue siendo incierto (Williamson y Clifford 2017).

Por otra parte, los polifenoles y sus metabolitos podrían también influir y modular la composición de la microbiota intestinal. De hecho, algunos autores sugieren que los polifenoles podrían tener un doble efecto positivo sobre la microbiota, inhibiendo bacterias patógenas y estimulando bacterias beneficiosas, actuando, de este modo, como prebióticos metabólicos (Hervert-Hernández et al.

2009). De hecho, se ha observado que los compuestos fenólicos de las bayas pueden llegar al intestino y afectar la microbiota intestinal, reduciendo el crecimiento de ciertas especies bacterianas y promoviendo el aumento de otras. En individuos con un intestino sano, estos efectos suelen ser beneficiosos. La investigación sobre el impacto de las bayas en la microbiota intestinal de voluntarios humanos es limitada y se ha centrado principalmente en su potencial capacidad para estimular el crecimiento de bifidobacterias. Por ejemplo, se ha visto que el consumo de una bebida de arándano durante 6 semanas aumentaba significativamente la población de bifidobacterias en el intestino de los participantes, especialmente *Bifidobacterium longum*, que se asocia con efectos de modulación del sistema inmunológico. En otro estudio donde se evaluó el consumo de productos de grosella negra por voluntarios sanos también se encontró un incremento en las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El efecto bifidogénico de las bayas podría atribuirse a su contenido en fibra y antocianos, así como la creación de un entorno redox favorable por los polifenoles presentes en las bayas, que promueve la selección de bifidobacterias (Cardona et al. 2013). En microbiotas alteradas por condiciones de salud, la suplementación con bayas o sus compuestos generalmente ha resultado en una mejora en la composición intestinal. Por ejemplo, la mezcla de antocianos de arándano y grosella negra en sujetos obesos mostró un aumento significativo en las poblaciones de Bacteroidetes y Actinobacteria, microorganismos anaerobios estrictos. Esta adición de antocianos también podría potencialmente reducir los niveles de oxígeno en el intestino, favoreciendo el crecimiento de bacterias sensibles a este gas (Cardona et al. 2013). También se observó que la suplementación de la dieta con arándanos en un modelo de ratón con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) reducía las poblaciones de *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp. y *E. coli*, sugiriendo el potencial de los extractos de arándano para aliviar esta patología (Williamson y Clifford 2010). En todo caso, es importante señalar que establecer asociaciones directas entre el consumo de bayas u otros alimentos y la regulación de la microbiota intestinal es complicado debido al limitado conocimiento existente sobre el papel específico de las especies bacterianas en la salud o la enfermedad, las variaciones

individuales en la composición de la microbiota, la diversidad de compuestos con efectos potenciales y la variedad de métodos utilizados en los estudios científicos (Dueñas et al. 2015).

2.3.4.2.4 Estudios de biodisponibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos de bayas en humanos

- Antocianos

Como se ha indicado anteriormente, la biodisponibilidad de los antocianos en el organismo humano es baja, menor que la de otros grupos de flavonoides, habiéndose estimado que es inferior al 1-2 %, teniendo en cuenta los niveles de antocianos y sus metabolitos de fase II encontrados en fluidos biológicos (Lila et al. 2016). Czank et al. (2013), en estudios realizados en voluntarios humanos que recibían una dosis oral de cianidina-3-*O*-glucósido marcada con ¹³C, calcularon una biodisponibilidad media de $12,38 \pm 1,38$ % basándose en la determinación del ¹³C eliminado a través de orina y aliento. Asimismo, determinaron que la mayor parte de ¹³C eliminado formaba parte de metabolitos derivados de la degradación por la microbiota intestinal, cuyos niveles eran en torno a 42 veces más elevados que los del antociano original y sus metabolitos de fase II.

La existencia de una baja biodisponibilidad de los antocianos fue también constatada por Milbury, Vita y Blumberg (2010), en un estudio en voluntarios que habían ingerido una dosis aguda de arándanos. Estos autores encontraron recuperaciones urinarias que variaban significativamente entre sujetos, desde menos del 0,1 % hasta el 3,2 %, indicando diferencias individuales en la absorción y metabolismo. Por su parte, Mueller et al. (2017) encontraron niveles de antocianos de arándanos más elevados en plasma y en orina de individuos con intestino intacto que en ileostomizados, lo que sugería que su absorción tenía lugar principalmente en el intestino delgado, con el estómago también actuando como un posible sitio de absorción. En un estudio con voluntarios sanos a los que daban frambuesas, González-Barrio et al. (2010) no detectaron antocianos ni sus

metabolitos en plasma. Sin embargo, en el fluido ileal de estos individuos, encontraron compuestos fenólicos del metabolismo de antocianos, indicando su posible metabolismo en enterocitos o hígado, con los productos retornando al tracto gastrointestinal a través de la excreción biliar. Por otra parte, en sujetos ileostomizados observaron que el 40 % de los antocianos eran recuperadas en el fluido ileal, sugiriendo que un porcentaje destacado de los antocianos ingeridas alcanzaría el intestino grueso en personas con un intestino intacto. Estas observaciones apoyan la baja disponibilidad de los antocianos en sus formas originales y su paso al intestino grueso, donde estarían sometidas a las interacciones con la microbiota colónica. Kalt et al. (2017) demostraron que la biodisponibilidad no sólo dependía de la cantidad ingerida, sino también de las pautas de consumo, ya que existía una tasa de absorción y retención superior de antocianos cuando el mismo volumen de un zumo de arándanos era tomado de una sola vez que cuando era distribuido en tres dosis a lo largo del día.

McGhie et al. (2003), en individuos que habían ingerido fresas, identificaron en plasma tanto pelargonidina-3-glucósido como su forma glucuronada, y en orina las formas glucuronadas o sulfo-conjugadas. Tras ingestión de moras, encontraron la mayoría de los antocianos como monoglucurónidos, así como glucósidos metilados y un sulfoconjugado de cianidina; además, de estos metabolitos también detectaron cantidades menores de algunos antocianos intactos no metabolizados en orina.

El conocimiento del metabolismo de los antocianos es menos extenso que el de otros flavonoides, aunque está claro que la naturaleza de la fracción de azúcar y el aglicón son determinantes clave en su absorción y excreción. La presencia de glicósidos de antocianos no metabolizadas en sangre y orina humana está bien documentada. Sin embargo, aunque algunos investigadores afirman que los antocianos no se metabolizan antes de pasar a circulación sistémica, la detección de conjugados glucurónido, metilo y sulfato parece sugerir que no es así; de hecho, entre el 68 % y el 80 % de los antocianos detectados en orina son derivados metabólicos (Lavefve, Howard y Carbonero 2020). La observación de antocianos no metabolizados podría deberse a varios factores, como la ingestión de dosis grandes que saturan la vía metabólica, o una

identificación incorrecta. El metabolismo de los antocianos parece depender de la naturaleza de los compuestos nativos, la matriz alimentaria y las características individuales del consumidor. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender completamente estos procesos y mejorar la utilización de antocianos en aplicaciones nutricionales y terapéuticas (Kaushal, Singh y Singh Sangwan 2022).

- Otros compuestos fenólicos

Tras el consumo de bayas, sean de la dieta habitual o de la suplementación, se han identificado en plasma de voluntarios sanos una variedad de metabolitos fenólicos conjugados, glucurónidos, sulfatos y derivados metilados, así como ocasionalmente los compuestos en su forma original. Para algunos de estos compuestos se ha observado en plasma una respuesta lineal a la dosis, aunque no en orina (Feliciano et al. 2017; Lavefve, Howard y Carbonero 2020). Así, se han encontrado niveles superiores de quercetina en plasma después de la ingestión de jugo de grosella negra en comparación con su grupo control (Erlund et al. 2006). En otro estudio reportado por el mismo grupo de investigación, en el que los participantes consumían diariamente 100 g de una mezcla de bayas, se observó un aumento del 30 al 50% en los niveles de quercetina en plasma después de 8 semanas (Erlund et al. 2003). Sin embargo, en un estudio donde se evaluaba el destino de los flavonoides tras la ingesta de arándano no se detectaron quercetina ni miricetina en plasma después de una dosis aguda del producto. En este estudio, al igual que en el anterior, la mayoría de los compuestos fenólicos se recuperaron en el plasma, aunque se encontraron moléculas con pesos moleculares más pequeños derivados del metabolismo por la microbiota intestinal. Los niveles de estos metabolitos en plasma mostraron dos picos de absorción, sugiriendo un efecto de segundo paso por la excreción de metabolitos de los compuestos inicialmente absorbidos a través de la bilis (Wang et al. 2012).

De igual manera, se ha estudiado el papel del intestino grueso en el metabolismo de los elagitaninos comparando individuos ileostomizados con

voluntarios con intestino intacto. De los tres elagitaninos encontrados en las frambuesas (sanguina H-10, sanguina H-6 y lambertianina C), solo se recuperó sanguina H-6 en el líquido ileal, representando el 25 % de la ingesta inicial; por el contrario, se encontró ácido elágico en el mismo compartimento con una cantidad equivalente al 241 % de su ingesta inicial, sugiriendo su formación a partir de la descomposición de los elagitaninos. En esta investigación no se detectaron elagitaninos en plasma de sujetos sanos, indicando su baja o nula absorción en el intestino delgado, aunque en orina se encontraron pequeños niveles de ácido elágico y urolitinas, procedentes de la metabolización por la microbiota intestinal, con una variabilidad significativa entre sujetos (del 0,3 % al 86 % de la ingesta de elagitaninos /ácido elágico) (González-Barrio et al. 2010). En estudios anteriores ya se había reportado que la biodisponibilidad de elagitaninos varía con la matriz alimentaria de origen, siendo, por ejemplo, mayor para frambuesas que para fresas, y la existencia de una alta variabilidad interindividual, sugiriendo una influencia significativa de la microbiota intestinal, la matriz alimentaria y posibles interacciones con otros componentes de la dieta (Cerdá, Tomás-Barberán y Espín 2005).

Los estudios sobre el papel de microorganismos individuales en el metabolismo de los polifenoles de las bayas son aún limitados, aunque parece clara la existencia de una gran variabilidad interindividual, destacando la capacidad única de cada persona para generar metabolitos específicos (Cerdá, Tomás-Barberán y Espín 2005; Ludwig et al. 2015; Lavefve, Howard y Carbonero 2020)

2.3.4.3 Actividad antioxidante

Por definición, un antioxidante es cualquier sustancia que previene, retrasa o elimina el daño oxidativo en una molécula diana. Los potenciales beneficios para la salud de los polifenoles se han atribuido tradicionalmente a su capacidad antioxidante, relacionada con su potencial para la captación de radicales libres y la quelación de metales con actividad redox, bien establecidos en sistemas in vitro y estrechamente relacionada con su estructura (Rice-Evans, Miller y

Paganga 1996). Muchos compuestos de esta familia han mostrado ser eficaces en la captura y reducción de diversas especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), como los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y radicales peroxilo lipídico ($\text{LOO}\cdot$), los cuales se producen continuamente durante el metabolismo normal del organismo (Hallwell y Gutteridge 1998). Igualmente, los polifenoles, y en particular los flavonoides, son capaces de formar complejos estables con metales divalentes, como hierro o cobre, a través de sus grupos hidroxilo y restos carbonilo, que pueden catalizar la producción de especies oxidantes, conduciendo a la oxidación de moléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (Leopoldini, Russo y Toscano 2011). Más recientemente se ha sugerido que los polifenoles podrían ejercer su función antioxidante en los sistemas biológicos no solo de manera directa, sino también a través de mecanismos indirectos. Entre estos mecanismos se incluye la capacidad para regular enzimas antioxidantes y desintoxicantes, modular vías de señalización redox e influir en la expresión génica (Hollman et al. 2011; López-Alarcón y Denicola 2013).

2.3.4.3.1. Captación de radicales libres (ROS)

Una consecuencia inevitable del metabolismo celular en organismos aerobios es la generación de radicales libres altamente reactivos de origen endógeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), caracterizadas por la presencia de uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Estos radicales tienden a dirigirse hacia sustratos con alta densidad electrónica o inestabilidad, como los átomos de nitrógeno en las proteínas, los ácidos nucleicos (ADN y ARN), y los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados. La interacción de las ROS con estas moléculas puede provocar alteraciones en su estructura, lo que conduce a una pérdida de funcionalidad biológica. La generación de ROS se produce en diferentes lugares dentro de la célula, principalmente como resultado de diversas reacciones metabólicas y procesos biológicos. Sin embargo, la mitocondria, y específicamente su cadena de transporte de electrones (CTE), es reconocida como la principal fuente de

producción de ROS (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz 2017; Raamsdonk y Hekimi 2010).

La capacidad de los polifenoles para captar radicales libres depende de varios factores estructurales críticos. Uno de los más determinantes es la disposición y cantidad de grupos hidroxilo en el anillo aromático, cuya proximidad y número directamente influyen en la efectividad antioxidante del polifenol. Estos grupos facilitan la donación de átomos de hidrógeno, esenciales para neutralizar radicales libres y proteger moléculas biológicas del estrés oxidativo. Además de los grupos hidroxilo, la estructura plana y la presencia de dobles enlaces conjugados son fundamentales para la actividad antioxidante de los polifenoles. Esta configuración estructural permite una conjugación electrónica que estabiliza el radical fenólico después de la donación de hidrógeno, reduciendo su reactividad y mejorando significativamente su capacidad antioxidante. Adicionalmente, otros grupos funcionales como cadenas de alquilo, dobles enlaces carbono-carbono y grupos carbonilo (C=O) también impactan la capacidad de los polifenoles para captar radicales libres. Estos grupos modifican la estructura del polifenol y su interacción con los radicales libres, lo cual puede tener efectos tanto positivos como negativos en su actividad antioxidante (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz 2017; Rice-Evans, Miller y Paganga 1996)

Se ha determinado que los polifenoles exhiben una mayor actividad antioxidante cuando presentan un mayor número de sustituyentes hidroxilo (Blokhina, Virolainen y Fagerstedt 2003). La presencia de agrupamientos catecol y galol en el anillo B, caracterizados por al menos dos grupos hidroxilo adyacentes, resulta determinante para una eficaz captación de radicales libres. De hecho, la eliminación de un grupo hidroxilo de un catecol resulta en una significativa disminución de la capacidad antioxidante (Santos-Buelga y González-Paramás 2016; Shiba et al. 2008). Por el contrario, la adición de un grupo hidroxilo adicional para formar un galol en el anillo B incrementa la actividad captadora de radicales en comparación con el catecol. Sin embargo, la incorporación de más grupos hidroxilo no muestra cambios sustanciales en la captación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shiba et al. 2008; Wang y

Brumaghim 2011). Otros criterios estructurales que contribuyen a la capacidad de captación de radicales libres incluyen la presencia de un doble enlace en C2-C3 conjugado con un grupo 4-oxo (C=O en posición C4) en el anillo C, lo cual facilita la deslocalización de electrones desde el anillo B y la estabilización del radical fenoxi intermedio. También se ha observado que la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones C5 y C7 puede mejorar la actividad antioxidante, siempre que estén acompañados por el doble enlace C2-C3 (Figura II.15) (Fraga et al. 2010; Wang y Brumaghim 2011)

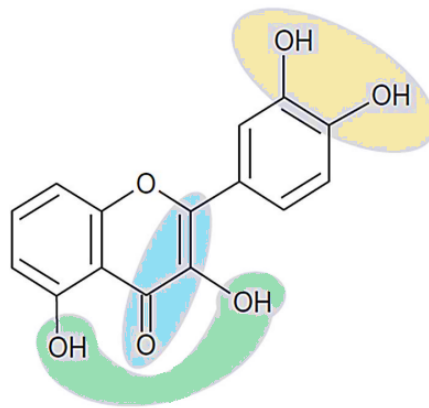


Figura II.15. Requisitos estructurales esenciales para la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

Fuente: Modificado de Fraga et al. (2010)

La capacidad antioxidante de los flavonoides puede aumentar notablemente cuando estos se polimerizan, como ocurre en los taninos condensados, debido al incremento en la cantidad de grupos hidroxilo. Por otro lado, modificaciones de los grupos hidroxilo, como la glicosilación o la metilación, suelen reducir el potencial antioxidante de estas moléculas en comparación con sus formas originales. En el caso de los ácidos fenólicos, que contienen un grupo ácido carboxílico unido al anillo aromático o a un sustituyente alquilo, la eficacia de su capacidad antioxidante varía según la posición y la naturaleza de estos sustituyentes (Heim, Tagliaferro y Bobilya 2002). Entre los antioxidantes más potentes y frecuentemente mencionados se encuentran el ácido elálgico, el resveratrol, conocido por su capacidad para donar hidrógeno, el ácido gálico, los antocianos, las proantocianidinas, la quercetina y el ácido clorogénico (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz 2017).

2.3.4.3.2. Actividad quelante de metales

La actividad antioxidante de los polifenoles no solo se debe a su capacidad para neutralizar radicales libres, sino también para actuar como quelantes de iones metálicos de transición, como el cobre y el hierro, además de ejercer su acción en metales como el cobalto y el manganeso (Fraga et al. 2010). Este mecanismo es crucial porque previene la formación de especies radicales iniciadoras, catalizadas por estos metales, que pueden causar daño celular significativo (Santos-Buelga y González-Paramás 2016). Por ejemplo, la interacción del Cu^+ con H_2O_2 conduce a la formación de radicales OH^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$, mientras que el Fe^{2+} cataliza, en presencia de peróxido de hidrógeno, la formación del radical hidroxilo OH^\bullet (Cherrak et al. 2016).

La capacidad de los polifenoles para quelar iones metálicos se basa principalmente en su estructura química, que permite la formación de complejos estables con estos iones. Se han identificado dos puntos principales de unión para los iones metálicos en las moléculas de compuestos fenólicos. El primero es la unidad catecol en el anillo B, que se refiere a la presencia de dos grupos hidroxilo adyacentes. Estos grupos pueden donar electrones para formar enlaces con iones metálicos como el hierro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) y el cobre ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$), facilitando la formación de complejos estables mediante interacciones de coordinación. Esta unión inhibe la capacidad de estos metales para participar en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, que generan especies reactivas de oxígeno (ROS). El segundo punto es la función 4-oxo en el anillo C, común en flavonoles y flavonas. Esta función, especialmente cuando se combina con grupos hidroxilo en las posiciones 3 (en flavonoles) o 5 (en flavonas), crea un sitio efectivo para la quelación de iones metálicos (Figura II.16). Ambos oxígenos, del grupo carbonilo y del grupo hidroxilo, participan en la unión del metal, formando un complejo bidentado que estabiliza el ion metálico y reduce su reactividad (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz 2017; Pietta 2000; Santos-Buelga y González-Paramás 2016).

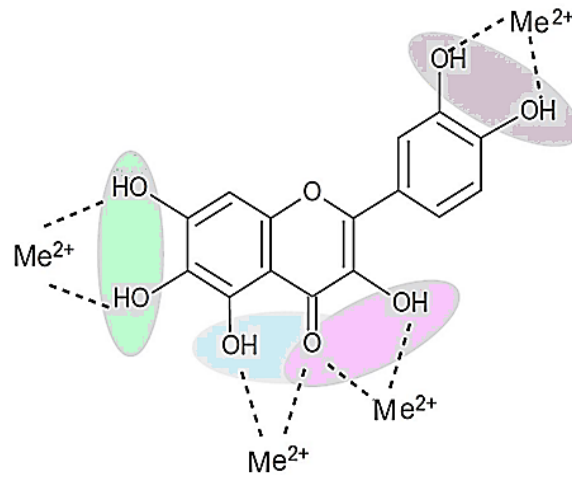


Figura II.16. Requisitos estructurales esenciales asociados a la actividad quelante de los compuestos fenólicos.

Fuente: Modificado de Fraga et al. (2010)

La capacidad antioxidante descrita para las bayas se debe principalmente a su contenido de polifenoles, como antocianos, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas. Estos compuestos tienen una destacada capacidad para unirse a metales y disminuir la disponibilidad de hierro libre a través de la quelación. Este proceso ayuda a reducir la producción de radicales libres promovida por el hierro, lo que contribuye significativamente a su efecto antioxidante (Pap et al. 2021). En flavonoles como quercetina y miricetina, existen dos sitios adicionales de unión: entre el 3-hidroxilo y el 4-carbonilo (sitio 3-hidroxilo-4-ceto) o entre el 5-hidroxilo y el 4-carbonilo (sitio 5-hidroxilo-4-ceto) del anillo C (Figura II.16) (Mira et al. 2002). Estudios sobre la unión de metales a quercetina a pH fisiológico revelan que la unión de metales en 5-hidroxilo-4-ceto es menos favorable que en 3-hidroxilo-4-ceto, probablemente debido a las diferencias en los valores de pK entre ambos grupos hidroxilo (Fernandez et al. 2002; Mira et al. 2002). Por otro lado, se ha observado que los antocianos con dos o más grupos hidroxilo libres en el anillo B tienen la capacidad de quelar iones metálicos multivalentes, como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Ti^{2+} y Sn^{2+} . Esta actividad quelante contribuye a la estabilidad del color de los antocianos, intensificando su tonalidad (efecto hipercromático), y produce cambios de tonalidad hacia el azul, especialmente a $\text{pH} \leq 6$. En particular, los antocianos con estructuras catecol (como cianidina) o pirogalol (como delphinidina)

en el anillo B son particularmente efectivas en la quelación de metales (Tang y Giust 2020).

2.3.4.3.3. Capacidad para modular enzimas pro-oxidantes

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de enzimas relacionadas con los mecanismos antioxidantes endógenos constituye una interacción compleja y beneficiosa en la protección celular contra el estrés oxidativo (Lü et al. 2010). Por una parte, estos compuestos tienen la capacidad de aumentar la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Además, pueden inhibir la expresión o la actividad de enzimas que generan especies reactivas de oxígeno (ROS), como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, que cataliza la producción de $O_2^{\cdot-}$ en neutrófilos activados, y la xantina oxidasa (XO), que oxida hipoxantina y xantina ácido úrico, generando $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (González-Manzano et al. 2012; Szwajgier, Borowiec y Pustelniak 2017). Por consiguiente, los polifenoles pueden actuar como cofactores o inhibidores de estas enzimas, dependiendo de su estructura química y su interacción específica con los sitios activos enzimáticos. Por ejemplo, algunos polifenoles mejoran la actividad enzimática de las SODs, que convierten superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), reduciendo así el estrés oxidativo celular y, asimismo, incrementan la actividad de la catalasa, que descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno, proporcionando una protección adicional contra los efectos perjudiciales del peróxido de hidrógeno (Lü et al. 2010).

Los polifenoles no solo afectan la actividad de enzimas implicadas en procesos redox, sino que también pueden inducir la expresión génica de enzimas detoxificantes de fase II a través de diversas vías de señalización celular, siendo la vía Keap1-Nrf2 una de las más estudiadas y esenciales para la respuesta antioxidante y defensa celular contra el estrés oxidativo. Entre las enzimas inducidas por los polifenoles se incluyen la NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión-S-transferasa (GST) y UDP-glucuronosil transferasa, cruciales en la neutralización y eliminación de tóxicos electrofilicos del organismo. La NQO1

desempeña un papel clave al reducir quinonas y otras sustancias potencialmente tóxicas que pueden inducir estrés oxidativo. Por su parte, las GSTs facilitan la conjugación del glutatión con compuestos electrofílicos, aumentando su solubilidad en agua y facilitando su excreción. Las UDP-glucuronosil transferasas catalizan la glucuronidación, un proceso en el cual el ácido glucurónico se une a sustancias lipofílicas para facilitar su eliminación a través de la orina. Estos mecanismos son esenciales para la detoxificación de xenobióticos y metabolitos endógenos que podrían resultar perjudiciales para las células (Shih, Yeh y Yen 2007). La inducción de elementos reguladores de fase II, como los elementos de respuesta antioxidante (ARE) o elementos de respuesta a electrófilos (EpRE), es fundamental para la adaptación celular ante la toxicidad de los compuestos fenólicos. Estos compuestos pueden generar quinonas potencialmente tóxicas que, a su vez, son sustratos de las enzimas antioxidantes, activando estas enzimas para su propia desintoxicación y fortaleciendo las defensas del organismo contra xenobióticos potencialmente tóxicos (González-Paramás et al. 2018).

La variedad de acciones bioquímicas de los polifenoles resalta su potencial como posibles agentes terapéuticos y preventivos en el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo y al envejecimiento. Mejorar la comprensión de estos mecanismos no solo amplía el conocimiento sobre el papel de los polifenoles en la salud, sino que también abre nuevas oportunidades para desarrollar estrategias nutricionales y terapéuticas basadas en estos compuestos naturales.

2.3.4.4 Estrés oxidativo en el envejecimiento

El envejecimiento se puede definir de diversas maneras, cada una desde una perspectiva diferente. Una de las definiciones más aceptadas lo describe como el conjunto de transformaciones morfológicas, metabólicas, funcionales y psicológicas que ocurren de manera irreversible en los organismos vivos con el tiempo. Estas transformaciones resultan en una disminución de la capacidad de adaptación a los cambios del entorno y una mayor dificultad para mantener la

homeostasis interna. Como consecuencia, aumenta la vulnerabilidad y la fragilidad del organismo (Zhor et al. 2023)

A lo largo de los años, se han propuesto numerosas teorías para explicar estos cambios, que se agrupan bajo el término general de "teorías del envejecimiento". En el siglo XX se propuso una de las primeras teorías estructuradas, denominada "Teoría del Desgaste". Charles Sherrington, propuso que el envejecimiento se producía por la acumulación de daño físico en los tejidos del cuerpo a lo largo del tiempo; sin embargo, esto carecía de una fundamentación biológica y molecular. En 1950, Denham Harman introdujo la "Teoría del Estrés Oxidativo". Como su nombre indica, esta teoría establece un vínculo entre el estrés oxidativo y el envejecimiento. Se planteó que a medida que envejecemos, la eficiencia de las enzimas antioxidantes y la producción de moléculas antioxidantes endógenas disminuyen y los mecanismos de reparación del ADN y las proteínas dañadas se deterioran. Estos factores provocan un aumento en los niveles de estrés oxidativo y esto a su vez se traduce en un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas (como el Alzheimer y el Parkinson) y cáncer. Esta teoría ha ganado prominencia y, hasta el día hoy, sigue siendo una de las explicaciones más aceptadas del envejecimiento desde una perspectiva molecular. Simultáneamente, Peter Mitchell y colaboradores, en la década de 1970, plantearon la "Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres". Esta teoría incide en la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento de las células somáticas especializadas, donde las ROS generadas en las mitocondrias dañan el ADN mitocondrial (ADNmt). Este daño conduce a una disminución en la renovación mitocondrial debido a la progresiva alteración oxidativa de proteínas y lípidos de sus membranas, lo que a su vez promueve la autofagia de estas estructuras. Como resultado, se produce una reducción correspondiente en la producción de adenosín trifosfato (ATP). Posteriormente, con los avances de la investigación en genética y biología molecular han surgido nuevas teorías, entre las cuales se encuentra el acortamiento de los telómeros, estructuras protectoras

en los extremos de los cromosomas, que contribuiría al envejecimiento celular y a la senescencia (Bapteste et al. 2023; Pérez et al. 2009; Viña 2019).

Es importante mencionar que la generación de ROS no es la única causa del envejecimiento celular. Los fallos en los procesos biológicos, como ineficiencias metabólicas, presencia de proteínas no funcionales y mutaciones también juegan un papel crucial en este proceso. Bajo esta premisa, las estrategias para prolongar la vida deberían ir encaminadas tanto a disminuir la acumulación de daño como a desplazar el metabolismo celular hacia estados en los que se generen diferentes tipos de daño, para minimizar su efecto. Actualmente, las investigaciones sobre el envejecimiento están siendo encaminadas hacia las áreas de la plasticidad neural, la epigenética y la inflamación crónica, con el fin de comprender mejor los mecanismos subyacentes al envejecimiento y desarrollar estrategias para promover una longevidad saludable y prevenir enfermedades relacionadas con la edad (Benedetto y Müller 2019).

2.4 *Caenorhabditis elegans*

2.4.1 Características generales

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre, conocido comúnmente como gusano redondo no segmentado, y es ampliamente utilizado como organismo modelo en biología y genética. Fue descrito por primera vez en 1900 por el zoólogo Emile Maupas, quien lo llamó *Rhabditis elegans*. En 1940, Ellsworth Dougherty reclasificó la especie dentro del género *Caenorhabditis*, renombrándola como *Caenorhabditis elegans*, nombre que se mantiene hasta hoy. Etimológicamente, *Caeno* significa nuevo, *rhabditis* varilla, y *elegans* bonito (Hope 1999).

El uso de *C. elegans* en la investigación comenzó en 1963 cuando el científico británico Sydney Brenner obtuvo la cepa N2 y la seleccionó como organismo modelo para estudios de biología del desarrollo, especialmente útil en estudios genéticos, debido a su simplicidad y facilidad para manipular genéticamente. Actualmente, la cepa N2 es la cepa silvestre de referencia (Brenner 1973).

Caenorhabditis elegans habita en el suelo y es capaz de tolerar un amplio rango de temperaturas intermedias, por lo que se encuentra en la mayoría de las regiones templadas del mundo. Su principal fuente de alimento proviene de microorganismos, especialmente bacterias como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* (Hodgkin 2005). Para su supervivencia y reproducción, este organismo requiere condiciones ambientales específicas, como temperaturas que oscilen entre los 10 y 25 °C, niveles adecuados de humedad, la presencia de oxígeno atmosférico y acceso a una fuente de alimento, como cepas no patógenas de la bacteria *E. coli*. Esto hace posible cultivarlo en el laboratorio en grandes cantidades, tanto en medio líquido como en placas Petri, y propagar rápidamente formas mutantes de una manera fácil y barata (C Kenyon 1988).

Las larvas de *C. elegans* recién eclosionadas miden aproximadamente 0,25 mm, mientras que los adultos alcanzan alrededor de 1 mm de longitud y tienen un diámetro de 70-80 µm. No emiten olor intenso y su pequeño tamaño y cuerpo transparente permiten observar sus células y órganos internos con un microscopio binocular (Corsi, Wightman y Chalfie 2015). Se desplazan creando leves ondas sinusoidales en un plano dorsoventral. Existen dos formas sexuales, macho y hermafrodita autofertilizante, lo que facilita su cultivo en grandes cantidades en el laboratorio. Sin embargo, debido a su rápido crecimiento y capacidad de autofertilización, es necesario tomar medidas especiales para estabilizar un cultivo sincronizado (Meneely, Dahlberg y Rose 2019).

Otras características importantes del nematodo incluyen la eutelia, es decir, un número constante de células (el gusano macho presenta 1031 células somáticas y el gusano hermafrodita 959) y un linaje celular prácticamente invariable. Estas características han sido fundamentales para la detección y obtención fiable de fenotipos mutantes (Sulston et al. 1983).

En 1998, se completó la secuenciación del genoma de *C. elegans*, siendo el primer organismo multicelular en lograr este hito. El tamaño de su genoma corresponde a 100.258.171 pares de bases (Hodgkin 2005). Este logro fue fundamental para la biología molecular y la genómica. Su importancia en la investigación fue reconocida en 2002 cuando Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por sus

descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada en este organismo. En 2006, Andrew Fire y Craig Mello también recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por descubrir el mecanismo de interferencia de ARN (RNAi) en *C. elegans*, una técnica que permite silenciar genes específicos y ha revolucionado la biología molecular (Corsi, Wightman y Chalfie 2015).

El impacto de *C. elegans* en la investigación científica es amplio y profundo. Este organismo ha sido esencial en estudios sobre el envejecimiento y la longevidad, ayudando a identificar genes y vías que afectan la duración de la vida. Además, ha facilitado la comprensión de la muerte celular programada (apoptosis) y sus mecanismos, lo que tiene importantes implicaciones para la salud y las enfermedades (Meneely, Dahlberg y Rose 2019).

2.4.2 Anatomía

- Morfología

El plano de su cuerpo está formado por un tubo exterior y un tubo interior separados entre sí por un espacio pseudocelómico. El tubo externo está formado por cutícula, hipodermis, musculatura, sistema nervioso, sistema excretor, gónadas y coelomocitos. Mientras que el tubo interno, está formado por el músculo de la faringe junto a su sistema nervioso autónomo y el intestino (Riddle et al. 1997) (Figura II.19).

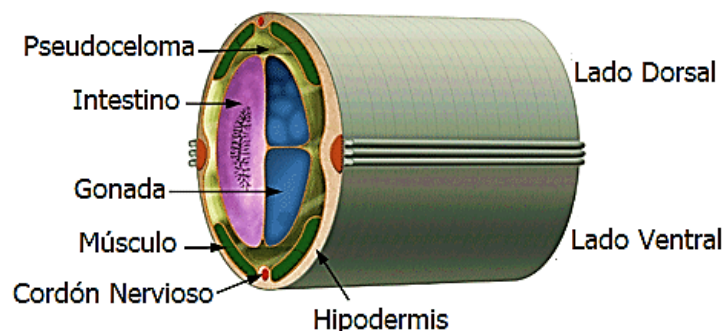


Figura II.19 Anatomía de *Caenorhabditis elegans*: sección transversal del cuerpo principal
Fuente: (Corsi, Wightman y Chalfie 2015)

El tubo externo está revestido por una cutícula que desempeña varias funciones cruciales para la supervivencia y el funcionamiento del nematodo. Principalmente compuesta de colágeno, esta cutícula forma una matriz fibrilar resistente y también contiene otras proteínas estructurales que contribuyen a su resistencia y flexibilidad. Además de servir como una barrera física que protege al nematodo contra daños mecánicos, infecciones microbianas y deshidratación, la cutícula proporciona puntos de anclaje para los músculos del nematodo, permitiendo así su movimiento coordinado y la locomoción (Hodgkin 2005). A pesar de su función protectora, la cutícula también presenta cierta permeabilidad a gases, líquidos y moléculas pequeñas, lo que facilita el intercambio de gases respiratorios y la absorción de nutrientes a través de ella. Esto contribuye al metabolismo y la homeostasis del nematodo. *Caenorhabditis elegans* experimenta un proceso de muda periódica, durante el cual elimina su cutícula antigua y secreta una nueva. Este proceso permite el crecimiento y desarrollo del nematodo al liberarse de su antigua cutícula. La cutícula recién formada es inicialmente más suave y flexible antes de endurecerse con el tiempo (Kramer 2018). La hipodermis de *C. elegans* se localiza bajo su cutícula externa y tiene la función de secretar esta estructura; además, juega un papel relevante en la regulación del equilibrio osmótico y en la interacción del organismo con su entorno (Chisholm y Hsiao 2013; Hodgkin 2005).

La estructura muscular de *C. elegans* está compuesta por un conjunto de músculos longitudinales y oblicuos que se extienden a lo largo de su cuerpo. Estos músculos están organizados en cuatro bandas y se conectan a la cutícula a través de la hipodermis. Están inervados por los cordones nerviosos dorsales (CND) y ventrales (CNV) y permiten el movimiento del nematodo mediante contracciones coordinadas, lo que genera las características ondas sinusoidales de movimiento en un plano dorsoventral (Bird y Bird 1991). Además de los músculos longitudinales, hay músculos oblicuos que conectan las bandas longitudinales y contribuyen al movimiento y la locomoción del nematodo. Estos músculos están controlados por el sistema nervioso del animal, lo que permite una coordinación precisa de los movimientos. La musculatura de *C. elegans* es

esencial para su capacidad de desplazamiento y exploración del entorno (White, Southgate y Brenner 1986).

- Sistema nervioso

El sistema nervioso de *C. elegans*, a pesar de tener un número relativamente pequeño de neuronas, es un modelo importante para comprender los principios básicos de la neurobiología, debido a su estructura altamente organizada y su capacidad para generar comportamientos complejos (White, Southgate y Brenner 1986).

Los nematodos hermafroditas presentan 302 células nerviosas, mientras que los machos cuentan con 383 células nerviosas. Las neuronas extra de los machos se encuentran localizadas en la cola masculina especializada para la cópula (Cook et al. 2019). La mayoría de las células del sistema nervioso están dispuestas en ganglios en la cabeza, en la médula ventral y en la cola, y forman un intrincado sistema de conexiones sinápticas, que han sido meticulosamente mapeadas, lo que permite una transmisión de señales eléctricas y químicas altamente específica a lo largo del sistema nervioso (Hobert 2010).

El ganglio cefálico, o anillo nervioso, actúa como su principal centro de procesamiento. Desde este centro, los cordones nerviosos dorsales y ventrales, que contienen axones de neuronas motoras y sensoriales, se extienden a lo largo del cuerpo del nematodo, coordinando comportamientos esenciales como la locomoción, la búsqueda de alimento, la respuesta a estímulos ambientales y la interacción social entre individuos (Figura II.20) (Goodman y Schwarz 2003; Oikonomou, Shaham y Words 2011).

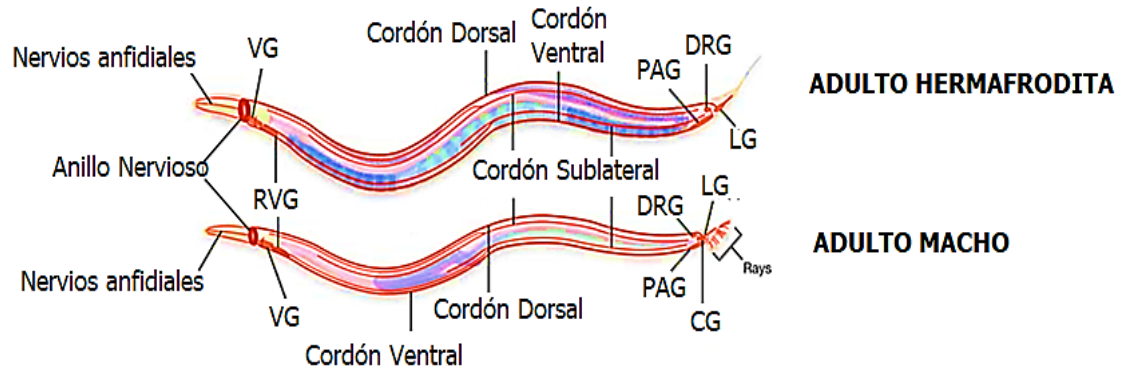


Figura II.20. Principales tractos nerviosos y ganglios de un hermafrodita y un macho adultos de *Caenorhabditis elegans*: CG: ganglio cloacal; DRG: ganglio dorsorrectal; LG, ganglio lumbar; PAG, ganglio preanal; RVG: ganglio retrovesicular; VG, ganglio ventral.

Fuente: (Cook et al. 2019)

Aunque el sistema nervioso de *C. elegans* es mayormente fijo en cuanto al número y la conectividad de las neuronas, exhibe cierto grado de plasticidad neuronal. Esto se refleja en su capacidad para adaptarse a cambios en el entorno y en la capacidad de aprendizaje y memoria, que se ha demostrado en estudios experimentales (Oikonomou y Shaham 2011).

- Sistema digestivo

El sistema digestivo está formado por una faringe y un intestino, que se extiende desde la cabeza a la cola. La boca, ubicada en el extremo anterior del cuerpo, sirve como la entrada al sistema digestivo y está rodeada por labios equipados con estructuras sensoriales para la localización y manipulación del alimento (Riddle et al. 1997). Justo después de la boca, se encuentra la faringe, una estructura muscular en forma de bomba que succiona el alimento, principalmente bacterias, y lo dirige hacia el intestino. La faringe cuenta con células musculares y nerviosas especializadas que regulan su contracción y relajación, facilitando así una ingesta eficiente de alimentos (Figura II.21) (Avery y Shtonda 2003).

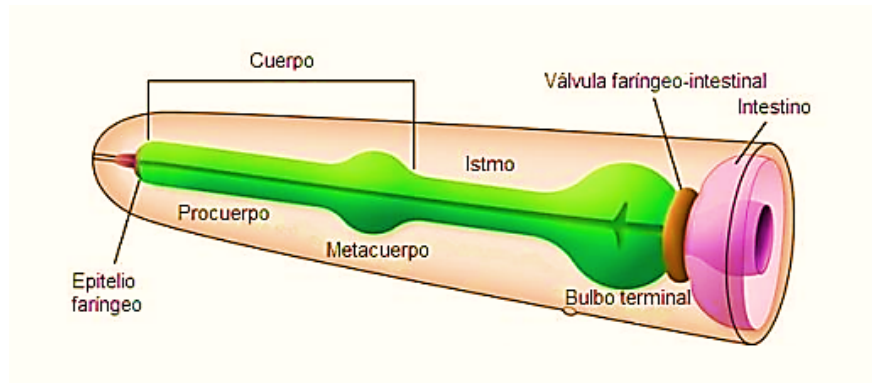


Figura II.21. Anatomía faríngea de *Caenorhabditis elegans*
Fuente: (Wormatlas 2024)

El intestino de *C. elegans* es un tubo largo y hueco que se extiende desde la faringe hasta el ano. Está compuesto por una sola capa de células epiteliales, lo que facilita la absorción de nutrientes. En este órgano, los alimentos son digeridos por enzimas digestivas producidas por las células intestinales, lo que permite la absorción de nutrientes esenciales a través de la membrana intestinal. Este proceso garantiza que el nematodo obtenga los componentes necesarios para su crecimiento y mantenimiento (Dimov y Maduro 2019). En el extremo posterior del cuerpo se encuentra el ano, que actúa como el punto de salida de los desechos sólidos no digeridos. A través de contracciones musculares coordinadas, los desechos son expulsados del cuerpo, completando así el proceso digestivo y manteniendo la higiene interna (Corsi, Wightman y Chalfie 2015).

Caenorhabditis elegans es un predador voraz que muestra una notable capacidad para ingerir diversos tipos de partículas y organismos pequeños presentes en su entorno. Esta versatilidad en su dieta le permite adaptarse a diferentes ambientes y fuentes de alimento, lo que es beneficioso tanto en la naturaleza como en el laboratorio (Shen et al. 2018). Utilizando sus quimiosensores y mecanosensores, *C. elegans* localiza las bacterias en el medio de cultivo y las ingiere con alta eficiencia, como lo demuestra su capacidad para ingerir *E. coli* en el laboratorio, alcanzando casi un 50 % de eficiencia. La simplicidad y eficacia de su sistema digestivo, junto con su capacidad para ingerir diversos tipos de alimento, hacen de este nematodo un organismo modelo ideal para estudios de biología y genética (Lewis y Fleming 1995).

- Sistema excretor

Su sistema excretor es un ejemplo de simplicidad y eficiencia biológica, siendo esencial para la homeostasis y la eliminación de desechos metabólicos. Este sistema está dominado por una estructura principal, la célula H, que se extiende a lo largo del cuerpo del nematodo. La célula H destaca no solo por su tamaño y forma, sino también por sus prolongaciones que se ramifican y conectan a varias partes del cuerpo, facilitando la distribución y recolección de fluidos corporales (Riddle et al. 1997). Los conductos excretores, que se originan en la célula H, se dirigen hacia la parte anterior del cuerpo y desembocan en un poro excretor localizado cerca de la boca del nematodo. A través de este poro, los productos de desecho metabólico y el exceso de agua son expulsados del cuerpo, asegurando así la limpieza interna del organismo y la eliminación de sustancias potencialmente tóxicas (Figura II.22) (Nelson y Riddle 1984).

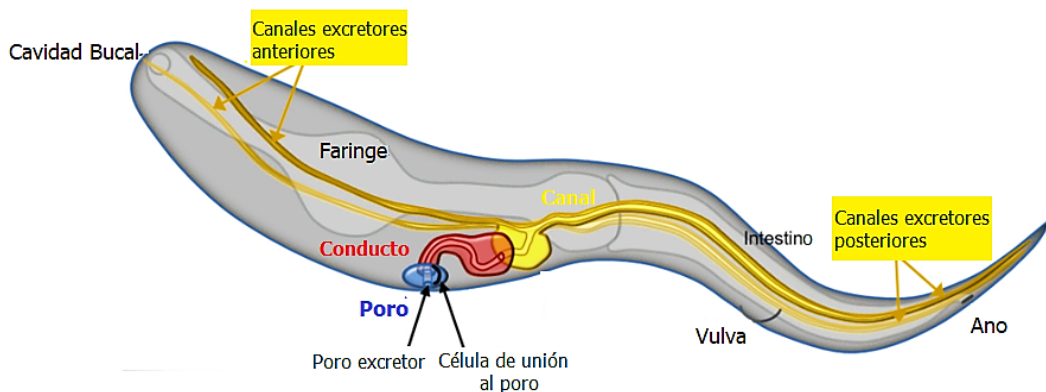


Figura II.22. Diagrama en perspectiva (anteriormente cercano, posterior lejano) que muestra la posición de las células del sistema excretor y los largos canales tubulares que se extienden a lo largo de *Caenorhabditis elegans*.

Fuente: (Buechner, Yang y Al-Hashimi 2020)

La osmorregulación es otra función crítica del sistema excretor de *C. elegans*. Al regular el balance de agua y solutos, este sistema mantiene la homeostasis interna, vital para el funcionamiento óptimo del nematodo en diversas condiciones ambientales. La capacidad de osmorregulación le permite adaptarse a cambios en la disponibilidad de agua y en la concentración de solutos

en su entorno (Nelson y Riddle 1984). La actividad del sistema excretor está regulada por señales neuroendocrinas, que ajustan la excreción en respuesta a las necesidades fisiológicas del nematodo. Estas señales aseguran el funcionamiento adecuado del sistema excretor, permitiendo al nematodo responder eficientemente a desafíos ambientales y mantener su equilibrio interno (Hedgecock y White 1985).

- Sistema inmune

El sistema inmunitario de *C. elegans* es menos complejo que el de los mamíferos, sin embargo, presenta una serie de mecanismos eficaces para combatir las infecciones y responder a los estímulos externos. Se basa en una respuesta innata que implica el reconocimiento de patrones moleculares asociados con microorganismos invasores, utilizando receptores específicos para detectar la presencia de patógenos como bacterias y hongos, desencadenando respuestas defensivas. Un importante mecanismo de defensa es la producción de péptidos antimicrobianos, los cuales actúan como agentes antimicrobianos, alterando la integridad de la membrana celular bacteriana y causando la muerte de los microorganismos invasores (Fares y Grant 2002; Schulenburg y Félix 2017). Además, *C. elegans* recurre a la fagocitosis como estrategia para eliminar patógenos, donde células fagocíticas engullen y destruyen microorganismos invasores, contribuyendo a la erradicación de infecciones y la limpieza de residuos celulares. Aunque estas células son menos especializadas que los macrófagos y neutrófilos de mamíferos, desempeñan un papel vital en la respuesta inmune del nematodo (Schulenburg y Félix 2017). Actualmente, se conoce que la regulación y coordinación de su sistema inmunitario se realiza mediante diversas vías de señalización y factores de transcripción. Estas vías, como la del factor de necrosis tumoral (TNF) y la del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), controlan la expresión de genes relacionados con la defensa contra patógenos y la respuesta inmune (D. Kim y Ewbank 2018).

Caenorhabditis elegans no posee un sistema inmunitario adaptativo con memoria inmunológica. Sin embargo, se ha observado cierto grado de respuesta inmune "adaptativa" en estudios experimentales. Esto sugiere que el nematodo

puede desarrollar resistencia a patógenos previamente encontrados, aunque este proceso aún no se comprende completamente (Pujol et al. 2001).

- Sexo y sistema reproductor

Caenorhabditis elegans posee 5 cromosomas somáticos diploides (I, II, III, IV, V) y un cromosoma sexual. Este último determina el sexo; en hermafroditas es diploide (XX) y en machos es haploide (XO). Además, presenta dos formas principales de reproducción: fecundación cruzada y autofecundación (Hodgkin 2005).

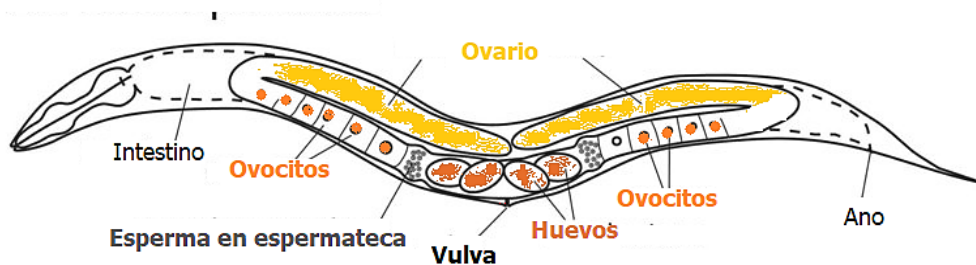
En la fecundación cruzada, *C. elegans* puede presentar dos sexos distintos: machos y hermafroditas. Los machos son relativamente escasos en la población natural, representando aproximadamente solo el 0,1 %. Estos individuos poseen un sistema reproductor masculino que incluye gónadas y órganos copulatorios especializados llamados espículas, que se utilizan durante el proceso de cópula para transferir esperma a las hembras hermafroditas.

Los hermafroditas son la forma reproductora más común. Estos organismos tienen la capacidad de producir tanto esperma como óvulos en sus gónadas, lo que les permite autofecundarse. La autofecundación implica la fertilización de los óvulos por el esperma producido por el mismo individuo, lo que resulta en la generación de una descendencia genéticamente idéntica al progenitor (Figura II.23). Esta capacidad de autofecundación es una característica distintiva de *C. elegans* y ha sido objeto de numerosos estudios en genética y biología del desarrollo (Jorgensen y Mango 2002; Zarkower y Biology 2005).

Las estructuras reproductoras, conocidas como gónadas, desempeñan un papel fundamental en la producción de gametos y el desarrollo embrionario de *C. elegans*. Estas formaciones se sitúan en el centro del cuerpo del nematodo y se encargan de generar y madurar tanto óvulos como espermatozoides, dependiendo del sexo del individuo. En los nematodos hermafroditas, las gónadas adoptan una disposición bilateral compuesta por dos brazos gonadales enrollados simétricamente en ambos lados del cuerpo. Cada brazo gonadal está compuesto por células germinales en diferentes estados de desarrollo, desde células germinales inmaduras hasta óvulos maduros. Durante el proceso de ovogénesis, estas células germinales evolucionan hasta convertirse en óvulos, los cuales son

liberados en el útero del nematodo para su posterior fecundación o deposición. En los nematodos machos, las gónadas son estructuras más simples conformadas por dos testículos que albergan células germinales en distintas fases de desarrollo, desde etapas iniciales hasta espermatozoides maduros. Estos espermatozoides son liberados en el medio ambiente durante la cópula, donde pueden fertilizar los óvulos presentes en el útero de las hembras hermafroditas. La actividad de las gónadas está regulada por diversos factores genéticos y ambientales que influyen en la proliferación, diferenciación y maduración de las células germinales, así como en la liberación de los gametos (Sawada, Inoue y Iwano 2014; Singson 2001). A pesar de su aparente simplicidad, el estudio del sexo y el sistema reproductor de *C. elegans* ha proporcionado valiosos conocimientos sobre una variedad de mecanismos biológicos, incluyendo la diferenciación sexual, la evolución del sexo y la genética de la reproducción (Singson 2001).

XX HERMAFRODITA



XO MACHO

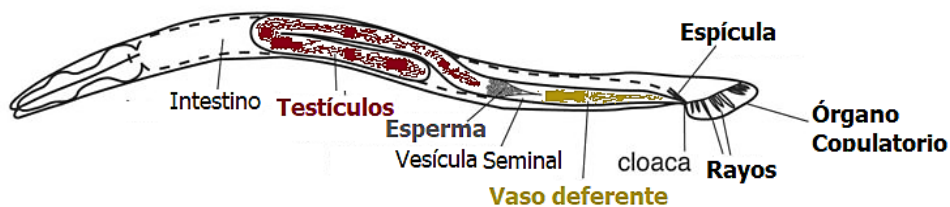


Figura II.23. Anatomía de *C. elegans*. Principales estructuras anatómicas de un individuo hermafrodita y un macho.

Fuente: (Sawada, Inoue y Iwano 2014)

2.4.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. elegans* (Figura II.24) comienza con la fertilización del óvulo, mediante autofecundación en hermafroditas o a través de fecundación cruzada con machos. Una vez fertilizados, los óvulos se desarrollan en el útero del nematodo hermafrodita y, tras una serie de divisiones celulares rápidas y controladas, forman las capas germinales necesarias para el desarrollo del organismo. Aproximadamente 12-14 horas después de la fertilización, las larvas L1 eclosionan del huevo y comienzan a alimentarse de bacterias (Hodgkin 2005).

El desarrollo larval de *C. elegans* incluye cuatro estadios: L1, L2, L3 y L4. Durante el estadio L2, si las condiciones ambientales son desfavorables, las larvas pueden entrar en un estado de reposo conocido como *dauer*, lo que les permite sobrevivir largos periodos sin comida. Cuando las condiciones mejoran, las larvas *dauer* reanudan su desarrollo normal. En los estadios L3 y L4, las larvas experimentan un crecimiento rápido y una mayor diferenciación, especialmente en los órganos reproductivos, preparándose para la madurez sexual (Figura II.25) (Brenner 1974; Zarkower y Biology 2005).

Tras completar los cuatro estadios larvales, alcanzan la madurez sexual en aproximadamente tres días a una temperatura de 20 °C. Este período de reproducción dura varios días, durante los cuales los nematodos pueden producir una gran cantidad de descendientes. Los hermafroditas pueden producir hasta 300-350 huevos a través de autofecundación, y este número puede aumentar si hay apareamiento con machos (Félix 2010; Singson 2001).

Con el envejecimiento, la capacidad reproductiva de los adultos disminuye, y eventualmente dejan de producir óvulos. En condiciones de laboratorio, un adulto puede vivir hasta 2-3 semanas, durante las cuales pasa por un período de senescencia antes de morir. Su ciclo de vida rápido y bien definido, junto con la capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo convierte en un organismo modelo valioso para la investigación científica proporcionando una visión clara de los procesos de desarrollo y reproducción (Sulston et al. 1983).

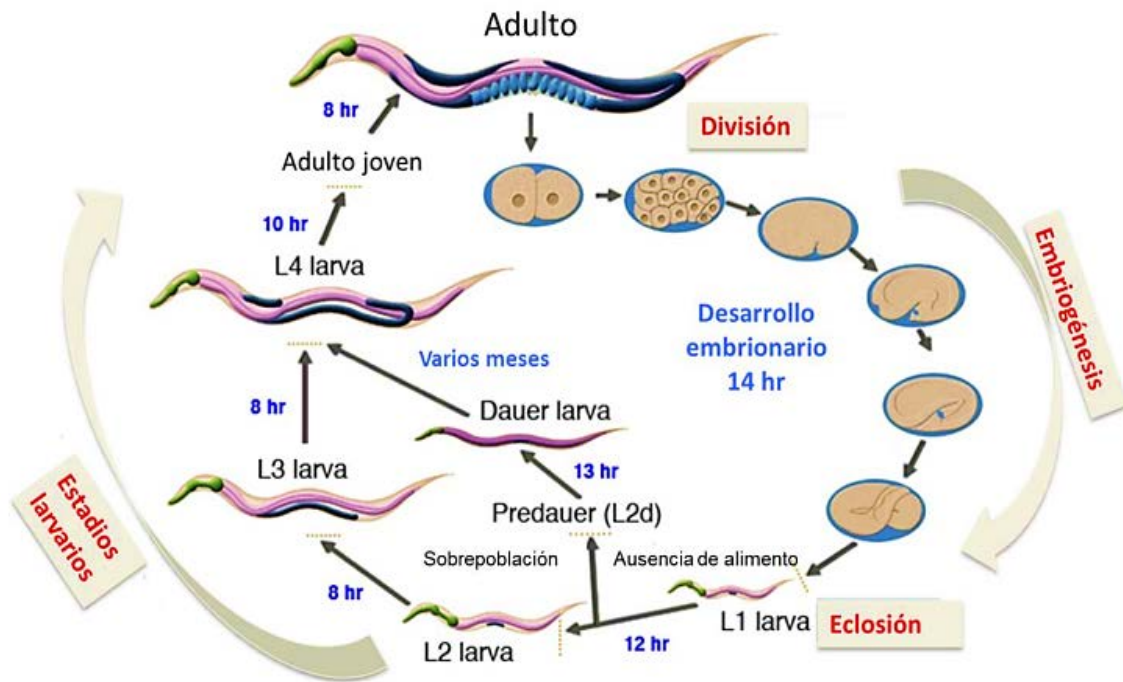


Figura II.24. Ciclo de vida de *C. elegans* a 20 °C.
Fuente: <http://www.wormatlas.org/>

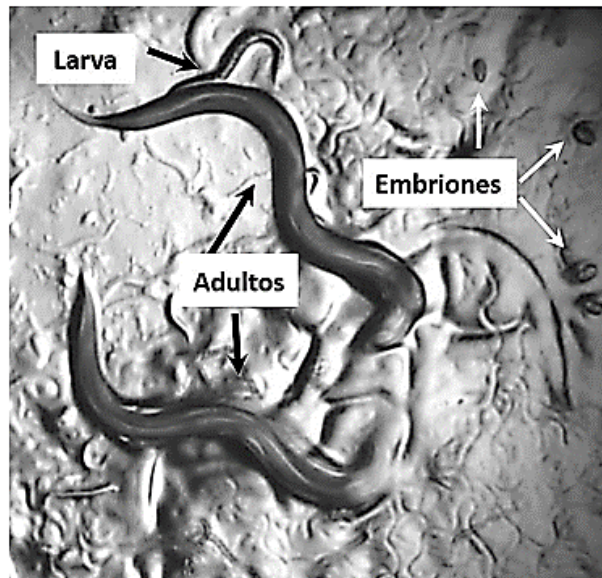


Figura II.25. Etapas del desarrollo de *C. elegans* bajo condiciones de laboratorio
Fuente: (Wormatlas 2024)

2.4.4 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

Caenorhabditis elegans es un importante organismo modelo en diversos campos de investigación debido a sus características únicas y su capacidad para ofrecer información valiosa en la elucidación de procesos biológicos esenciales y enfermedades humanas (Riddle et al. 1997). Actualmente es utilizado en genómica, biología celular, neurociencias y estudios de envejecimiento (Nigon y Félix 2013).

Destaca por ser un organismo multicelular con un sistema de órganos y tejidos completamente desarrollado, lo que facilita el estudio de la biología de un organismo complejo en un entorno controlado. Además, su reducido tamaño, ciclo de vida corto y transparencia permiten una observación y experimentación eficientes, posibilitando la realización de estudios detallados en un corto período de tiempo (Corsi, Wightman y Chalfie 2015). Este nematodo ha desempeñado un papel crucial en la elucidación de las vías genéticas que regulan procesos celulares esenciales como el desarrollo, la muerte celular y el envejecimiento (O'Reilly et al. 2013).

Los investigadores cuentan con una variedad de herramientas genéticas avanzadas para trabajar con *C. elegans*. Estas incluyen las deleciones específicas, que emplean técnicas como la mutagénesis, que introduce mutaciones aleatorias mediante radiación o agentes químicos, y CRISPR-Cas9 para eliminar segmentos específicos del ADN. Además, las microinyecciones de ADN se utilizan para crear transgenes que se expresen en líneas somáticas y germinales, mientras que el bombardeo biolístico facilita la introducción de ADN en las células mediante la propulsión de partículas recubiertas de ADN. Por otro lado, la técnica de RNA de interferencia (RNAi), relacionada con el silenciamiento específico de genes, también es una herramienta poderosa para el estudio de la función génica (Shen et al. 2018).

La apreciación de *C. elegans* en la investigación también se atribuye a la conservación de rutas moleculares y celulares con los humanos, con una homología genética compartida entre el 60 % y el 80 %. Aproximadamente el 40 % de los genes humanos asociados con enfermedades tienen ortólogos en *C. elegans*, lo que lo convierte en un buen modelo para estudiar enfermedades

humanas complejas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la diabetes o algunos procesos relacionados con el cáncer. Por ejemplo, investigaciones con este organismo modelo han permitido identificar genes y vías que contribuyen a la acumulación de proteínas tóxicas en la enfermedad de Alzheimer y la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. Además, ha sido útil para estudiar la regulación de los niveles de azúcar en sangre y la resistencia a la insulina en diabetes, así como la proliferación celular y la apoptosis en cáncer (Kaletta y Hengartner 2006).

3.4.4.1 Rutas moleculares y genes implicados en el envejecimiento y respuesta a estrés

Numerosos estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans* han demostrado la existencia de diversos genes y vías de señalización, altamente conservados en los mamíferos, que regulan la respuesta al estrés y el envejecimiento en estos organismos. Además, han proporcionado valiosa información sobre los mecanismos que regulan estos procesos. Parte de estas investigaciones han explorado cómo los compuestos fenólicos afectan los mecanismos moleculares específicos en *C. elegans*, como se detalla en el apartado 3.4.5. Entre estos mecanismos se incluyen las rutas de señalización de la insulina/IGF-1, sir-2.1/SIRT1, TOR, skn-1, línea germinal, y genes relacionados con la función mitocondrial, que controlan procesos biológicos fundamentales como la reproducción, el desarrollo, el metabolismo, el ciclo celular, el mantenimiento somático, la longevidad y la resistencia al estrés (Shen et al. 2018).

- Ruta de señalización de la insulina/IGF-1

La ruta de señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1, Insulin-like Growth Factor), comúnmente referida como IIS, juega un papel importante en la regulación del crecimiento, desarrollo, metabolismo y longevidad en una amplia variedad de organismos, desde simples invertebrados hasta mamíferos (Altintas, Park y Lee 2016). En *C. elegans*, la vía de señalización

de la insulina regula procesos fisiológicos tales como la formación del estado de resistencia *dauer*, el envejecimiento y la longevidad, el metabolismo y la capacidad de respuesta frente a diversos tipos de estrés ambiental, como el estrés osmótico, la hipoxia, la escasez de alimentos, el estrés térmico, la toxicidad por metales y el estrés oxidativo. Para ello, IIS coordina la transmisión de señales de manera secuencial y adaptativa, ajustándose a las condiciones del entorno (Altintas, Park y Lee 2016; Schuster et al. 2010; Tullet et al. 2009)

El proceso comienza cuando la insulina se une al receptor de insulina (IR) y el IGF-1 al receptor IGF-1 (IGF-1R). Ambos receptores transmembranales son tirosina quinasas receptoras (RTK), lo que significa que tienen actividad enzimática intrínseca. Esta particularidad, les permite fosforilar una variedad de sustratos, principalmente a miembros de la familia de proteínas IRS (sustratos del receptor de insulina), en residuos de tirosina, sirviendo como plataformas de anclaje para otras proteínas con dominios SH₂. Varios componentes claves de la IIS en *C. elegans* están conservados evolutivamente, como *daf-2* y *age-1*, ortólogos del receptor insulina/IGF-1 (InR) y de la quinasa 3-OH fosfatidilinositol (PI3K), respectivamente. En ambos gerontogenes se encontraron mutaciones que duplican la vida media en la cepa silvestre del nematodo (Friedman y Johnson, 1988; Kenyon et al., 1993). Este descubrimiento junto con la modulación por hormonas peptídicas representaron los primeros hallazgos en la genética del envejecimiento en *C. elegans* (Kimura et al. 1997; Louis Lapierre y Hansen 2008).

Caenorhabditis elegans expresa unos 40 péptidos del tipo a la insulina (ILPs), que pueden ser antagonistas o agonistas de DAF-2. Por ejemplo, durante el estrés o escasez de alimento, antagonistas como INS-1 son capaces de inhibir la señalización de DAF-2 y como consecuencia activar DAF-16 y promover la resistencia al estrés y el desarrollo del estado *dauer*. Por el contrario, en situaciones de abundancia de alimentos, los agonistas como INS-70 activan la señalización de DAF-2 y promueven la reproducción y el crecimiento del nematodo. La activación de DAF-2 se produce cuando los ILPs se unen al receptor, induciendo a un cambio conformacional y por consiguiente la

fosforilación de los residuos tirosina en el receptor y la activación de AGE-1 (Louis Lapierre y Hansen 2008).

Una vez activada, AGE-1 cataliza la conversión de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃), lo que conlleva el aumento de la concentración de PIP₃ en la membrana celular. Por otro lado, cuando está activo, DAF-18/PTEN cataliza la conversión de PIP₃ a PIP₂. Las señales generadas por PIP₃ activan la cascada de señalización por medio de varias quinasas, como la quinasa 1 inducible de suero y glucocorticoide (SGK-1), la proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK-1) y la proteína quinasa B (AKT-1/-2). El proceso culmina con la fosforilación de sustratos en fases posteriores y, por tanto, su posterior inactivación. Uno de estos sustratos es el factor de transcripción DAF-16/FOXO. Cuando éste está fosforilado queda secuestrado en el citoplasma impidiendo la activación de genes que promueven la longevidad y la resistencia al estrés. Como resultado, los organismos muestran un crecimiento y una esperanza de vida normales (Lin et al. 2007; Ogg et al. 1997).

El análisis genético revela que DAF-16/FOXO junto con SKN-1, homólogo del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), y HSF-1, el factor de transcripción de choque térmico, son los factores de transcripción más importantes en la regulación de la longevidad mediante la vía IIS. La fosforilación de estos factores afecta a la interacción con otras proteínas que gestionan su localización dentro de la célula y evitan su entrada al núcleo. Entre ellas se encuentran la familia de proteínas 14-3-3 (PAR-5 y FTT-2), que interactúan con DAF-16 controlando su localización citoplasmática, y las proteínas DDL-1, DDL-2 y HSB-1, que se unen a HSF-1, inhibiendo su función e impidiendo la activación de genes de choque térmico que son importantes para la longevidad y la resistencia al estrés (Altintas, Park y Lee 2016; Chiang et al. 2012). Por otro lado, la inhibición del receptor DAF-2, puede ser inducida por estrés ambiental (oxidativo, térmico o inanición), señalización reducida de la vía IIS por varios factores endógenos o un aumento en la actividad de DAF-18/PTEN. Esto favorece la activación de otros factores de transcripción clave y, a su vez, su traslocación del citoplasma al núcleo. En definitiva, la vía IIS funciona como un sistema intrincado en el que múltiples componentes

transducen señales que regulan el proceso de envejecimiento adaptándose a las condiciones del entorno extracelular (Murphy y Hu 2013). En la Figura II.17 se recoge un esquema de la ruta de señalización de la insulina (IIS) en *C. elegans*.

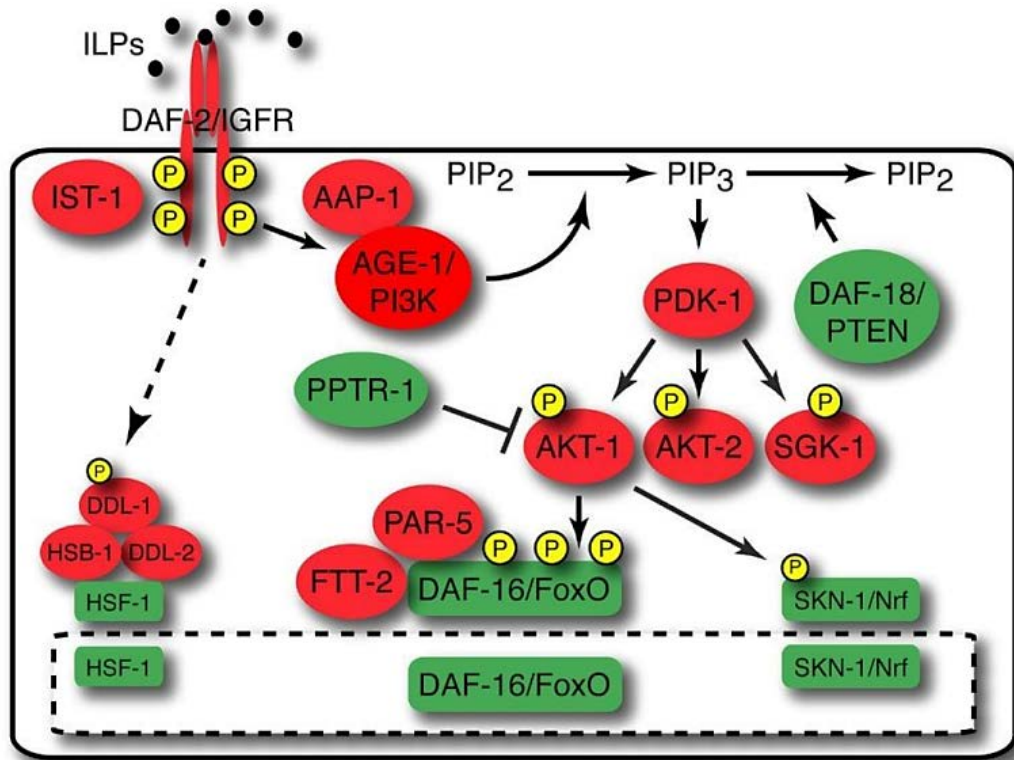


Figura II.17. Ruta de señalización de la insulina (IIS) en *C. elegans*. La activación de la vía IIS promueve el secuestro citoplasmático de los factores de transcripción DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf. DAF-2, dependientes de la fosforilación. El ortólogo del receptor insulina/IGF-1 y otros componentes de IIS están coloreados en rojo, y las moléculas que antagonizan a o son antagonizadas por esta vía se muestran en verde. Los péptidos similares a la insulina (ILPs) que pueden tanto promover como antagonizar la actividad de DAF-2, están representados como puntos de color negro. Fuente: (Murphy y Hu 2013).

Además de la vía principal de la IIS, existen otros mecanismos que afectan la regulación de DAF-16/FOXO, incluyendo la acción de diferentes quinasas alternativas, como la ruta JNK-1 (c-Jun N-terminal kinase) (Oh et al. 2005), CST-1 (homólogo de la proteína quinasa Ste20 de mamíferos MST-1) (Lehtinen et al. 2006) y AAK-2 (homólogo de la proteína quinasa activada por AMP, AMPK) (E. Greer et al. 2007), o proteínas como la enzima E3 ubiquitin ligasa y RLE-1 (proteína de la familia de metiltransferasas de arginina) (Takahashi et al. 2011).

Una vez en el núcleo, los factores de transcripción DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf2 desempeñan roles importantes en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, DAF-16/FOXO modula la expresión de genes como *spp-1* y *lys-7*, fundamentales en la defensa contra patógenos bacterianos. En *C. elegans*, estos genes codifican péptidos antimicrobianos con el objetivo de mantener la homeostasis y combatir infecciones microbianas. Además, DAF-16/FOXO influye en la expresión de catalasa (*ctl-1*), una enzima antioxidante clave que neutraliza ROS y protege a la célula del estrés oxidativo (Tullet et al. 2008; Murphy y Hu 2013). Por otro lado, el factor de transcripción HSF-1, no solo está involucrado en la respuesta al estrés térmico sino también en la transcripción de un conjunto de genes diana, como las proteínas de choque térmico, implicadas en el plegamiento de proteínas y en la proteostasis celular bajo condiciones de estrés (Hsu, Murphy y Kenyon 2003). HSF-1 se une a regiones específicas de ADN que contienen sitios de respuesta al choque térmico (HSEs), lo que conduce a la activación de genes que codifican chaperonas moleculares como HSP-70 y HSP-16 (Kay et al. 1986). Se ha determinado que la sobreexpresión de chaperonas inducidas por HSF-1 se correlaciona con un aumento en la esperanza de vida de *C. elegans* (Walker y Lithgow 2003; Yokoyama et al. 2002). Esto se atribuye a la sobrerregulación de una red de chaperonas que suprimirían el plegamiento incorrecto de proteínas (Hsu, Murphy y Kenyon 2003). Finalmente, el factor de transcripción SKN-1/Nrf2 regula la expresión de genes como *gst-4* y *mtl-1* implicados en la resistencia al estrés oxidativo y desintoxicación en respuesta a una reducción en la señalización IIS. La glutatión-S-transferasa, producida por el gen *gst-4*, es una enzima que cataliza la conjugación de glutatión con productos de oxidación y xenobióticos, mientras que *mtl-1* codifica metalotioneína, proteína capaz de adherirse a metales pesados facilitando su excreción y protegiendo a la célula del daño oxidativo (Nebert y Vasiliou 2004). Cabe mencionar que SKN-1 también produce un incremento de la longevidad, aunque de manera independiente a DAF-16/FOXO (Tullet et al. 2008; Tullet et al. 2017) y, al igual que HSF-1, promueve la homeostasis proteica a través de la regulación del proteosoma (Kahn et al. 2008).

El factor de transcripción nuclear eritroide-2 (Nrf2), pertenece a una familia de proteínas que poseen un dominio cremallera de leucinas (bZip) en la región C-terminal. Este dominio es clave para que Nrf2 sea capaz de unirse al ADN y polimerizar otras proteínas (Kensler, Wakabayashi y Biswal 2007, Blackwell et al. 2015). Nrf2 junto con proteínas Nrf/CNC cumplen funciones tales como la protección y mantenimiento en mamíferos. Su función más conocida es la regulación de las defensas xenobióticas y antioxidantes, mediante la activación de enzimas detoxificantes y antioxidantes. Este factor, también está implicado en otros procesos biológicos importantes como la regulación metabólica (metabolismo energético y homeostasis de nutrientes) y la proteostasis a través del sistema ubiquitina-proteasoma y chaperonas moleculares (Blackwell et al. 2015; Hayes y Dinkova-Kostova 2014; Kensler, Wakabayashi y Biswal 2007). Además, se ha descrito su participación en la regulación de genes de enzimas detoxificantes de fase II y proteínas antioxidantes, como glutatión, glutatión peroxidasas (GPx), glutatión-S-transferasas (GST), superóxido dismutasas (SOD) o NAD(P)H-quinona oxidorreductasa (NQO-1) (Chen, Zhang y Cai 2014; Nguyen, Nioi y Pickett 2009). Estos mecanismos permiten a Nrf2 orquestar una respuesta integral a desafíos tóxicos y oxidativos, promoviendo así la supervivencia y el correcto funcionamiento del organismo bajo condiciones de estrés.

En condiciones normales, Nrf2 está inactivo y permanece retenido en el citoplasma debido a su unión con la proteína inhibidora Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). En respuesta al estrés oxidativo, provocado por diversos estímulos oxidativos o electrófilos. El complejo Nrf2-Keap1 tiende a disociarse por modificaciones en los residuos de cisteína de Keap1, lo que lleva a la eventual translocación de Nrf2 al núcleo. Una vez en el núcleo, Nrf2 es capaz de dimerizar con otros factores de transcripción bZIP, como las proteínas Maf (grandes y pequeñas). Posteriormente, el heterodímero se une a elementos de respuesta antioxidante (ARE), localizados en la región promotora de genes que codifican proteínas antioxidantes y enzimas de fase II (Figura II.18) (Koch et al. 2014; Hayes y Dinkova-Kostova 2014; Nguyen, Nioi y Pickett 2009; Surh, Kundu y Na 2008).

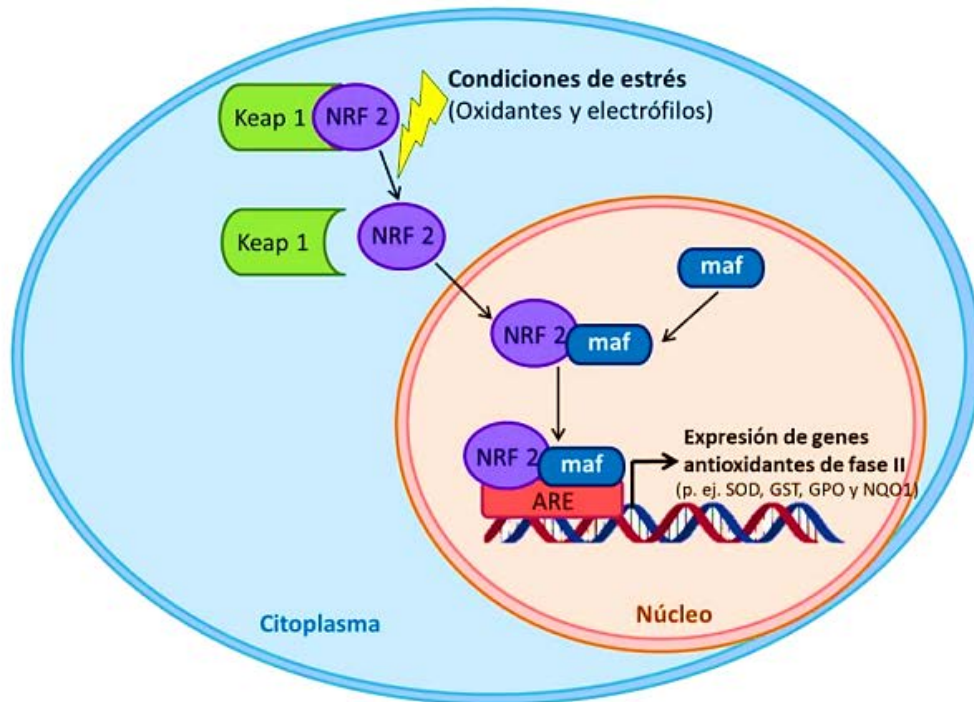


Figura II.18. Ruta de señalización de SKN-1/ Nrf2

En *Caenorhabditis elegans*, el gen *skn-1* codifica una secuencia funcional ortóloga a las proteínas Nrf/CNC de mamíferos. Una de las diferencias más importantes entre SKN-1 y las proteínas Nrf/CNC es la estructura del dominio de unión al ADN. Mientras que las proteínas Nrf/CNC de mamíferos contienen un módulo bZIP, SKN-1 carece de este. A pesar de ello, SKN-1 es capaz de unirse a secuencias específicas del ADN y activar la transcripción de genes antioxidantes y de detoxificación, cruciales en los procesos de proteostasis, inmunidad y metabolismo del organismo. Además, SKN-1 regula diversas vías génicas de las proteínas Nrf/CNC de mamíferos, desempeñando funciones análogas involucradas en la defensa celular contra el estrés oxidativo y en el mantenimiento de la homeostasis redox (K. Blackwell et al. 1994, 2015). La mutación en *skn-1* resulta en una disminución de la resistencia al estrés oxidativo y una menor duración de vida. Sin embargo, la sobreexpresión de SKN-1 aumenta la longevidad y la resistencia al estrés oxidativo (An y Blackwell 2003; An et al. 2005; Tullet et al. 2008).

- Vía de señalización SIR-2.1/SIRT1

Las sirtuinas pertenecen a una familia de proteínas desacetilasas que actúan predominantemente de manera dependiente a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta familia de proteínas está conservada evolutivamente en muchos organismos (Shen, Wang y Zuo. 2018). En *C. elegans*, *sir-2.1* codifica la sirtuina homóloga de SIRT1 en mamíferos, y responde a los cambios metabólicos en el entorno celular, incluida la disponibilidad de nutrientes, energía y estrés celular (M. D. Hirschey 2013). La sobreexpresión de SIR2.1 extiende la longevidad, lo que sugiere que *sir-2.1* es un regulador conservado del proceso de envejecimiento. En este sentido, los estudios en *C. elegans* sugirieron por primera vez un papel para las sirtuinas en la regulación de FoxO, ya que se ha demostrado que el aumento de la expresión de *sir-2.1* extiende la vida de una manera dependiente de DAF-16/FoxO (Tissenbaum y Guarente 2001). Las sirtuinas interactúan físicamente con DAF-16 in vivo en *C. elegans* y con FoxO en células de mamíferos intactas, y también se ha descrito que, en respuesta al choque térmico, la asociación física de SIR-2.1 y DAF-16/FoxO requiere de las proteínas 14-3-3 (Berdichevsky et al. 2006). Esta observación sugiere que SIR-2.1 puede controlar el estado de acetilación de DAF-16/FoxO de una manera análoga a la regulación de los factores de transcripción de FoxO de mamíferos por SIRT1 (Brunet et al. 2004; Motta et al. 2004; Van Der Horst et al. 2004).

3.4.5 Estudios sobre bayas en *Caenorhabditis elegans*

Multitud de estudios han descrito que bayas como moras, arándanos, fresas o frambuesas poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras, lo que sugiere su potencial para mejorar la salud y prevenir enfermedades. En los últimos años se han realizado investigaciones donde se analiza el impacto de compuestos presentes en las bayas en la longevidad, el envejecimiento, la salud metabólica y otras funciones biológicas en *C. elegans*. Para ello, se han empleado una variedad de enfoques experimentales, incluyendo análisis genéticos, pruebas de comportamiento y estudios bioquímicos, con el objetivo de explorar los mecanismos subyacentes a estos efectos. En esta

revisión se recogen estudios donde se ha empleado *C. elegans* para la evaluación de la actividad de extractos de bayas ricos en polifenoles, un tema abordado específicamente en la presente Tesis Doctoral, con un enfoque particular en las moras y los arándanos. En la Figura II.26 se muestra, en forma de esquema simplificado, la vía de señalización de la insulina/IGF-1, ruta que varios de estos estudios coinciden en señalar como una diana sobre la que diversas clases de polifenoles pueden influir.

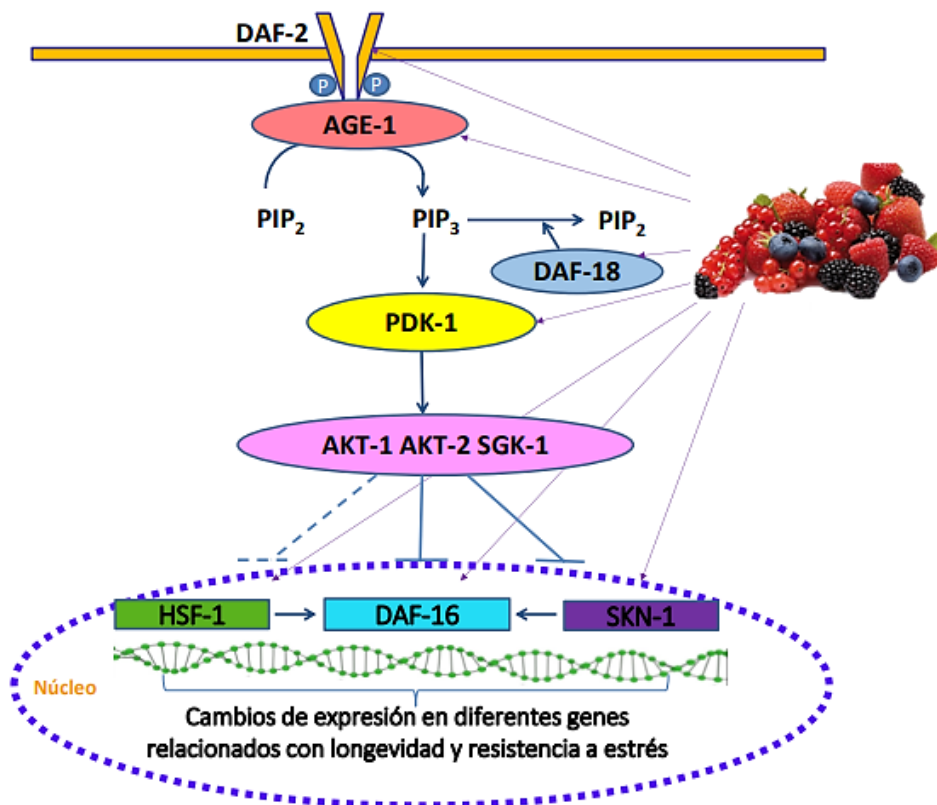


Figura II.26. Esquema simplificado de la ruta de señalización de la insulina, señalando los posibles objetivos moleculares que, según la bibliografía, podrían ser modulados por ciertas clases de polifenoles.

Fuente: Adaptado de (González-Paramás et al. 2018)

- Estudios con extractos de arándanos

Las investigaciones centradas en la evaluación de los efectos biológicos de componentes del arándano en *C. elegans* son escasas. En un estudio llevado a cabo en nuestro departamento se analizaron marcadores de estrés oxidativo,

como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de enzimas antioxidantes endógenas, así como longevidad, motilidad y respuesta a estrés ambiental en la cepa silvestre de *C. elegans* tratada con diferentes concentraciones de un extracto de arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) rico en antocianos (González-Paramás et al. 2020). Se encontró que el tratamiento con el extracto a una concentración de 5 µg/mL aumentaba la resistencia al estrés y prolongaba significativamente la vida del nematodo, y también reducía los niveles de ROS tanto en gusanos sometidos a estrés oxidativo como en aquellos no estresados de edad avanzada. Sin embargo, a una concentración más alta de 10 µg/mL se observó una elevación en los niveles de ROS y un aumento significativo en la mortalidad de los gusanos jóvenes, sugiriendo la existencia de una posible respuesta hormética frente al tratamiento con antocianos, de manera que a partir de determinado nivel de concentración de los compuestos ensayados se producen efectos adversos, resultado también encontrado en ensayos realizados con otros polifenoles, como quercetina o extracto de orujo de uvas (Dueñas et al. 2013; Ayuda-Durán et al. 2019c). Se debe señalar que los efectos protectores de los compuestos fenólicos no siempre se correlacionan con una disminución en los niveles de ROS. Por el contrario, se ha descrito que algunos polifenoles podrían actuar como pro-oxidantes en los sistemas biológicos e inducir ligeros aumentos en el nivel basal de ROS, lo que activaría los mecanismos endógenos de defensa contra el daño oxidativo, resultando en un aumento de la protección global del organismo (Tang y Halliwell 2010). Este fenómeno se evidenció, por ejemplo, en el estudio de Ayuda-Durán et al. (2019a) en gusanos tratados con un flavonoide específico (epicatequina), tanto de la cepa silvestre de *C. elegans* como mutantes *knockout* en diferentes genes de la ruta de la insulina.

En todo caso, parece claro que no todos los compuestos fenólicos actúan a través de los mismos mecanismos de acción, sino que podrían incidir sobre diferentes dianas moleculares. Así, por ejemplo, el extracto de antocianos de arándanos fue también testado en cepas mutantes de *C. elegans* deficientes en genes clave de la vía de señalización de la insulina/IGF-1; los resultados obtenidos sugirieron que los factores de transcripción HSF-1 y DAF-16, que actúan en etapas avanzadas de la ruta podrían estar implicados en los efectos

protectores del extracto contra el estrés térmico en individuos jóvenes (Ana M. González-Paramás et al. 2020). Por su parte, Wang et al. (2018), en estudios realizados con cepas de *C. elegans* modificadas utilizando la tecnología de ARNi, observaron que la esperanza de vida media de los nematodos tratados con extractos de arándano aumentaba de manera dependiente de la dosis en el intervalo de concentraciones de 50 a 200 mg/mL, y que los nematodos tratados mostraban mayor resistencia a estrés térmico y a radiación ultravioleta-B que los no tratados. Estos autores concluyeron que estos efectos estaban mediados por la proteína DAF-16, ya que la supresión de *daf-16* mediante ARNi reducía la esperanza de vida de *C. elegans* e inhibía la expresión de *sod-3*. Scerbak et al. (2016) también encontraron un aumento en la esperanza de vida en *C. elegans* tratado con extractos de diversas especies de arándano, observando además que el tratamiento mejoraba marcadores de salud asociados con el envejecimiento, como la función neuronal, y reducía las aberraciones en neuronas mecanosensoriales anteriores (ALM), como los crecimientos prolongados y los cuerpos celulares anormales. Igualmente, Wilson et al. (2006) encontraron que el tratamiento con polifenoles de arándano (*Vaccinium angustifolium*) aumentaba la resistencia al estrés térmico y la longevidad en *C. elegans*. En este caso, observaron que el aumento de la longevidad estaba asociado con la activación de la ruta CaMKII, que regula la resistencia al estrés osmótico, específicamente a través de las proteínas OSR-1, UNC-43 y SEK-1. Sin embargo, no había evidencia de la participación de otras vías que suelen influir en la respuesta al estrés y la longevidad, como las sirtuinas o los factores de transcripción DAF-16 y SKN-1.

Aunque las observaciones realizadas por distintos autores difieren en cuanto a los mecanismos de acción implicados, todos los estudios comentados apuntan a la existencia de efectos beneficiosos de los polifenoles de arándano sobre la longevidad y los indicadores del envejecimiento, lo que sugiere su potencial utilidad como agentes terapéuticos.

- Estudios con extractos de moras

En la revisión bibliográfica realizada solo se ha encontrado un estudio que aborda específicamente los efectos de este tipo de bayas en *C. elegans*, publicado por Moraes et al. (2020), donde se evalúa un nuevo cultivar de mora (BRS Xingu) y otras tres variedades de *Rubus* spp (Tupy, Xavante y Guarani) en cuanto a su composición fenólica y capacidad antioxidante. Los extractos obtenidos estaban caracterizados por la presencia de elagitaninos, antocianos (especialmente cianidina-3-*O*-glucósido) y flavonoles (quercetina y kaempferol). Los investigadores observaron que el tratamiento con extractos de las moras reducía significativamente la producción de ROS inducida por exposición a juglona en los nematodos, siendo la actividad más elevada en el caso de la nueva variedad (BRS Xingu).

Aunque no hay más estudios realizados específicamente con moras en *C. elegans*, sí existen con antocianos característicos de las mismas, como cianidina-3-*O*-glucósido (C3G). En una investigación reciente, Nas y Medina (2023) determinaron que el tratamiento con 25 μ M de C3G prolongaba la vida útil de *C. elegans* en presencia y ausencia de estrés oxidativo, y mejoraba la tasa de bombeo faríngeo, incluso bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por H₂O₂ y radiación UVA. Por su parte, Chen et al. (2022) exploraron cómo C3G podría contrarrestar la toxicidad inducida por microplásticos de poliestireno (MDP) en la cepa silvestre y mutantes de *C. elegans*. Se observó que los efectos negativos de los MDP (aumento del estrés oxidativo y reducción de la longevidad) eran mitigados por el tratamiento con C3G, que producía un aumento en la expresión del gen *daf-16* y genes antioxidantes asociados (*clt-2*, *hsp-16.1*, *sod-3*, *sod-5*), especialmente destacado en el caso de *sod-3*, sugiriendo la importancia de la enzima SOD para el efecto de C3G

La quercetina (Q) es posiblemente el flavonol más estudiado en este organismo. Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con concentraciones de Q entre 70 y 200 μ M aumenta la vida media de la cepa silvestre N2 del nematodo (Dueñas et al. 2013; Grünz et al. 2012; Kampkötter et al. 2008; Saul et al. 2008; Surco-Laos et al. 2011). Sin embargo,

concentraciones inferiores a 50 μM o superiores a 250 μM no tienen efecto en la longevidad (Pietsch et al. 2009). Este flavonol mejora la resistencia al estrés térmico y oxidativo, reduciendo los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), tanto en condiciones normales como de estrés (Kampkötter et al. 2008; Grünz et al. 2012; Surco-Laos et al. 2011). Se ha debatido el papel de DAF-16 en los efectos de quercetina. Algunos estudios han observado la translocación inducida por Q de DAF-16 al núcleo, sugiriendo su participación en la mejora de la longevidad y la resistencia al estrés (Kampkötter et al. 2007; Kampkötter et al. 2008). No obstante, otros estudios sugieren que los efectos de Q no están asociados con DAF-16 (Grünz et al. 2012; Pietsch et al. 2009; Saul et al. 2008; Ayuda-Durán et al., 2016). Estas observaciones contradictorias podrían indicar que la translocación de DAF-16 al núcleo, aunque es un componente importante en las vías de longevidad, no es imprescindible para una vida más larga y, en el caso del tratamiento con quercetina, podría ser un efecto circunstancial más que un mecanismo subyacente.

Otros tipos de flavonoles también han sido objeto de investigación en *C. elegans*. La administración de kaempferol a una concentración de 100 μM resultó en un ligero aumento en la longevidad de la cepa silvestre, así como en una mejora en la capacidad de supervivencia y una disminución en los niveles de ROS intracelulares cuando el organismo estaba sometido a estrés térmico (Kampkötter et al., 2007). Nuevamente, se sugirieron como posibles mecanismos de acción la activación de la expresión de *sod-3* (Grünz et al. 2012) y la inducción de la translocación de DAF-16 al núcleo (Kampkötter et al., 2007), aunque, como se ha señalado, este último mecanismo podría no estar relacionado con los efectos observados sobre la longevidad y la reducción de los niveles de ROS. Por otro lado, Cai et al. (2011) evaluaron los efectos de icariina (8-prenil de kaempferol 3,7-*O*-diglucósido), un derivado de kaempferol presente en plantas del género *Epimedium* usadas en medicina tradicional china, y de icarisida II, su principal metabolito in vivo. Los autores encontraron que estos compuestos promovían la extensión de la vida media en *C. elegans* por un mecanismo dependiente de la ruta de la insulina (IIS), implicando genes como *daf-16*, *daf-2* y *hsf-1*, ya que la prolongación de la vida no era observada en cepas mutantes deficientes en los

mismos tratadas con icariina. El efecto se asoció a un aumento en la expresión de genes diana de los factores de transcripción DAF-16 y HSF-1, como *hsp-12.3* y *sod-3*, como consecuencia de la exposición al metabolito icarisida II.

Todo este conjunto de resultados apoya que distintos compuestos fenólicos pueden implicar diferentes mecanismos de acción en sus efectos, aunque, de una u otra manera, parecen implicar la ruta de la insulina/IGF-1.

- Estudios con extractos de otras bayas

Navarro-Hortal et al. (2022) observaron que el tratamiento con un extracto metanólico de fresa (*Fragaria × ananassa* cv Romina) era capaz de reducir la agregación de péptido β -amiloide y retrasar la parálisis inducida por el mismo, así como prevenir el daño oxidativo, asociados con la enfermedad de Alzheimer, sin mostrar toxicidad en ensayos de letalidad, bombeo faríngeo, crecimiento, reproducción, fertilidad o supervivencia, a dosis de 100, 500 o 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los posibles mecanismos moleculares detrás de estos resultados, explorados mediante tecnología de ARNi, revelaron la participación, al menos parcial, de las vías de señalización DAF-16/FOXO y SKN-1/NRF2. De manera similar, también se vieron efectos neuroprotectores tras tratamiento con un extracto rico en antocianos obtenido de la fruta Açai (*Euterpe precatoria* Mart.), con una mejora en los niveles de oxidación de proteínas y en la respuesta de quimiotaxis en nematodos mutantes con expresión neuronal de A β . La disminución de la oxidación de proteínas y la participación del factor de transcripción DAF-16/FOXO sugirieron que el extracto de Açai actúa a través de un mecanismo molecular que refuerza la red de homeostasis de proteínas (Peixoto et al. 2016) .

Por el contrario, en estudios realizados con preparados de bayas goji, de Freitas Rodrigues et al. (2021) encontraron efectos tóxicos, con una reducción de un 50 % en la vida útil de los nematodos y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en el intervalo de concentraciones ensayadas (1-20 $\text{mg}/\mu\text{L}$), explicados por los autores como posiblemente debidos a la actividad prooxidante de los polifenoles y carotenoides presentes en la baya. Los ensayos en cepas mutantes indicaron que estos efectos no estaban relacionados con las

vías DAF-16/FOXO o SKN-1. Estos hallazgos ponen de manifiesto que, aunque en general los compuestos fenólicos de las bayas parecen tener efectos beneficiosos, es necesario ser precavidos antes de recomendar su consumo y realizar más estudios en mamíferos, ya que dependiendo del tipo de producto y las dosis empleadas se pueden producir efectos indeseables.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y equipos

3.1.1 Equipos

- Agitador magnético SBS.
- Agitador Vortex IKA Genius 3.
- Autoclave Selecta modelo Presoclave II.
- Balanza analítica Mettler Toledo AG245.
- Baño de agua termostático P-selecta.
- BioMark high performance PCR system (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) equipado con el GE 96.96 Dynamic Array™ integrated fluidic circuit (IFC)
- Campana de flujo laminar Telstar modelo AV-30/70.
- Centrífuga para tubos eppendorf (Thermo Scientific Heraeus Fresco 17).
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) Agilent Technologies serie 1200.
- Espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher).
- Espectrómetro de masas Applied Biosystems modelo API 3200 Qtrap, equipado con fuente de ionización por electrospray y analizador de masas triple cuadrupolo/trampa de iones lineal controlado por el software Analyst 5.1.
- Homogeneizador Fastprep THERMO SAVANT FP120.
- Incubadora de agitación VWR.
- Incubadoras refrigeradoras Velp modelo FTC 901y IPP SS de Memert.
- Lector de placas FLUOstar Omega Ser.415-1562 BGM LABTECH.
- Lupa Leica M250 FA con cámara Leica DFC420C.
- Microcentrífuga, MiniStar silverline de VWR
- pHmetro Crisol Basic 20.
- Rotavapores Büchi R-124, con baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270.
- Sistema de producción de agua ultrapura Direct-QTM 3 (Millipore).
- Sonicador Microson™ XL2000 100.
- Ultracentrífuga refrigerada Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments).

3.1.2 Materiales, reactivos y disolventes

- **Applied Biosystems (Carlsbad, USA):** Mix y kit de retrotranscripción High Capacity cDNA.
- **Brand GMBH** (Wertheim, Germany): placas microtiter Brand 96 pocillos pureGrade y placas Petri de 35 y 60 mm.
- **Fluka Analytical** (Madrid, España): medio triptona.
- **Francisco Soria Melguizo, Valdemoro** (Madrid, España): Placas de 90 mm.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): dihidrógeno fosfato de potasio, monohidrógeno fosfato de potasio, ácido acético, sulfato de magnesio, 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), metanol, etanol, acetonitrilo y cloruro de potasio.
- **Panreac** (Barcelona, España): cloruro de sodio, cloruro de calcio, solución de hipoclorito de sodio 10 % w/v, metanol, cloruro de hidrógeno, hidróxido de sodio y dimetil sulfóxido (DMSO), nitrito de sodio, acetato de sodio trihidratado y cloruro de hierro hexahidratado.
- **Sigma-Aldrich** (Madrid, España): catequina, ampicilina (sal sódica), nistatina, agar, extracto de levadura, colesterol, 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUdR), 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triacina (TPTZ), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), tampón fosfato salino (PBS), trolox, carbonato de aluminio hexahidratado y ácido trifluoroacético.
- **Scharlab** (Barcelona, España): carbonato de sodio, ácido gálico.
- **VWR** (Fontenay-sous-Bois, Francia): etanol, ácido fórmico.

3.1.3 Cepas de *Caenorhabditis elegans*

La cepa silvestre N2 de *C. elegans* y las cepas mutantes CF1038, daf-16(mu86) I; PS3551, hsf-1(sy441) I; EU1, skn1(zu67) IV/nT1[unc-(n754)let] (IV;V), y *E. coli* OP50 resistente a ampicilina fueron obtenidas del *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EEUU).

3.1.4 Recolección de frutos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y mora (*Rubus glaucus* Benth)

- Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Los frutos del mortiño, arándano andino silvestre, fueron recolectados durante las campañas de cultivo de 2021, entre abril y noviembre.

Se seleccionaron dos provincias del Ecuador para la recolección de los frutos: Imbabura, ubicada a 3641 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), y Carchi a 2836 m.s.n.m. Para la elección de los lugares de recolección se consideró (i) la abundancia de las poblaciones de esta planta, (ii) el nivel de producción del fruto en tres estados diferentes de madurez en una misma planta y (iii) la diferencia de altitud entre las poblaciones. Los especímenes fueron identificados por el Prof. Wilson Vázquez (Universidad de Las Américas (UDLA), Ecuador) utilizando los especímenes de referencia depositados en los laboratorios de investigación de la UDLA.

En cada zona se recolectaron aleatoriamente tres lotes, de 0,1 Kg de frutos sin daño (físico, fisiológico o patógeno), de diferentes plantas. El estado de madurez se clasificó en función de su pigmentación (etapa 1: completamente maduro, color negro y apto para su consumo, etapa 2: 75 % pigmentado, fisiológicamente maduro y con un color rosado y etapa 3: menos del 50 % de pigmentación, color verde/rosado y escasa maduración) (Dalgo, Cuvi y Guerrero 2014). No se detectaron diferencias en cuanto al tamaño y forma de los frutos del mismo estado de madurez entre ambas altitudes, como se muestra en la Figura.III.1.



Figura.III.1. Arándanos andinos silvestres (*V. floribundum* Kunth) recolectados en tres estados de madurez, determinados por su pigmentación, a dos altitudes diferentes.

Cada área de recolección fue georreferenciada (Tabla III.1) y se consideraron las condiciones ambientales haciendo uso de una estación meteorológica. Se registraron valores promedio, mínimo y máximo cada 2 h durante un período de 10 días previos a la cosecha (Tabla III.2).

Tabla.III.1. Descripción geográfica de las localidades donde se recolectaron los arándanos andinos silvestres (*V. floribundum* Kunth).

Provincia	Carchi	Imbabura
Cantón	Montúfar	Ibarra
Parroquia	La Paz	Zuleta
Latitud	00°36.478 'N	00°13.523 'N
Longitud	77°49.716 'O	78°03.074 'O
Altitud (m.s.n.m)	2836	3641

Tabla.III.2. Condiciones ambientales de las localidades donde se recolectaron los frutos del arándano silvestre andino (*V. floribundum* Kunth).

	Temperatura (°C)	Humedad Relativa %	Punto de Rocío (°C)	Presión Atmosférica (hPa)	Viento (Km/h)	Lluvia (mm)
<i>Carchi</i>						
Promedio	10.2	86.7	7.9	708.1	1.6	7.9
Mínimo	2.2	43.0	-7.5	659.7	0.0	0.0
Máximo	20.1	99.0	12.3	734.8	16.6	55.1
<i>Zuleta</i>						
Promedio	8.6	59.1	7.1	688.5	3.9	4.6
Mínimo	1.8	38.0	-7.1	659.7	0.0	0.0
Máximo	18.2	99.0	11.5	733.7	23.0	55.1

- Mora (*Rubus glaucus* Benth)

Las moras andinas (*Rubus glaucus* Benth) o "Moras de Castilla" se cosecharon entre agosto y octubre de 2022. Para la recolección se seleccionó la provincia de Tungurahua, ya que representa el 70 % de la superficie nacional dedicada al cultivo de esta baya (5000 ha) (Ayala et al. 2016). Para la recolección de frutos se seleccionaron dos localidades contrastantes dentro de esta provincia: "Santa Lucía-El Triunfo", ubicada a 3200 m.s.n.m., y "Los Andes -Tontapi" a 2360 m.s.n.m. Las zonas productoras de mora, al igual que mortiño, se distribuyen a lo largo del corredor interandino del Ecuador. Los criterios utilizados para seleccionar las ubicaciones y la autenticación de los especímenes fueron idénticos a los descritos para el mortiño.

En cada zona se recolectaron aleatoriamente tres lotes, de 0,2 Kg de frutos intactos y sin daños (fisiológicos, físicos o patógenos), de diferentes plantas del huerto. Como en el caso del mortiño, los frutos fueron cosechados en tres estados de madurez, utilizando los indicadores subjetivos de pigmentación establecidos en las "Normas Técnicas-Instituto Ecuatoriano de Normalización" (INEN 2016). La primera etapa de maduración estuvo representada por un fruto completamente maduro (100 %), esto se alcanzó cuando todas las bayas del

fruto estaban enteramente moradas, casi negras. Los frutos con un 75 % de pigmentación corresponden al segundo estado de maduración, y se caracterizan por presentar la mayoría de las bayas un color rojo intenso y algunas son moradas. Finalmente, menos del 50 % de pigmentación corresponde al tercer estado, donde los frutos se caracterizan por la presencia de bayas en su mayoría rosadas (Figura.III.2). No se identificaron diferencias en el tamaño y/o forma de los frutos entre ambas altitudes en el mismo estado de madurez.

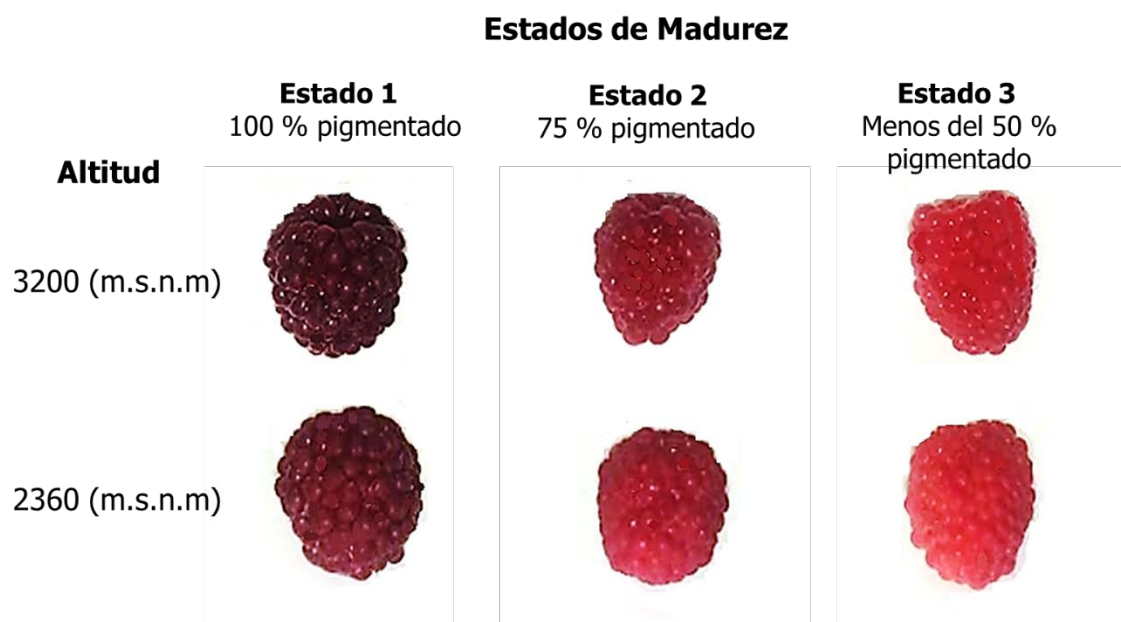


Figura.III.2. Mora andina (*R. glaucus* Benth) recolectados en tres estados de madurez, determinados por su pigmentación, a dos altitudes diferentes

En la Tabla.III.3 se muestra la georreferenciación, mientras que en la Tabla.III.4 se detallan las condiciones ambientales de cada zona de recolección. Los valores mínimo, máximo y promedio corresponden a los valores registrados cada hora durante un período de 5 meses, de abril a agosto de 2022, período en el que se recolectaron.

Tabla.III.3. Descripción geográfica de las localidades donde se recolectaron las moras (*R. glaucus* Benth)

Provincia	Tungurahua	Tungurahua
Cantón	Tisaleo	Patate
Parroquia	Santa Lucía - El Triunfo	Los Andes - Tontapi
Latitud	1°22.183´S	1°16.052´S
Longitud	78°39.545´W	78°30.298´W
Altitud (m.s.n.m)	3200	2360

Tabla.III.4. Condiciones ambientales de las localidades donde se recolectaron moras (*R. glaucus* Benth)

	Temperatura (°C)	Humedad Relativa %	Punto de Rocío (°C)	Presión Atmosférica (hPa)	Viento (Km/h)	Lluvia (mm)
<i>Santa Lucía - El Triunfo</i>						
Promedio	9.3	85.6	6.9	692.8	3.2	1588.9
Mínimo	3.6	47.0	1.7	689.9	0.0	-
Máximo	17.9	99.0	9.9	697.4	18.4	-
<i>Los Andes – Tontapi</i>						
Promedio	14.5	88.1	12.3	772.5	0.1	1218.0
Mínimo	7.5	35.0	6.7	764.3	0.0	-
Máximo	27.7	99.0	18.2	797.7	1.7	-

La mora y el mortiño fueron cuidadosamente transportados desde el sitio de cosecha hasta el laboratorio en un período no mayor a 24 horas. Una vez en el laboratorio, los frutos fueron seleccionados, retirando aquellos que sufrieron algún daño durante el transporte (p. ej., escurridos o rotos). A continuación, se agruparon los frutos seleccionados de diferentes plantas recolectadas a la misma altitud y en el mismo estado de madurez. Se formaron 6 grupos, tres estados de madurez por dos altitudes, y se congelaron inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de este proceso, los frutos fueron liofilizados y pulverizados hasta obtener un polvo fino. El polvo se mantuvo al vacío, en oscuridad y a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis composicional (no más de dos meses desde su preparación).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de los extractos hidroalcohólicos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y mora (*Rubus glaucus* Benth)

Tanto para la mora como para el mortiño, se pesó 1 g de cada muestra finamente pulverizada. A continuación, se añadieron 20 mL de una solución de metanol: agua (80:20, v/v) acidificada con ácido clorhídrico al 0,1 %. La mezcla se agitó, protegida de la luz, durante 2 h a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm (10 °C). El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de celulosa (25 µm). El residuo sólido se volvió a extraer una vez más y los sobrenadantes se combinaron. Cada una de las 6 muestras de mora o mortiño se analizaron por triplicado. Finalmente, cada uno de los extractos hidroalcohólicos fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis. Estos extractos fueron utilizados para todas las determinaciones que se indican a continuación, a excepción de la caracterización de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS para la que se prepararon nuevos extractos (ver 3.2.4).

3.2.2 Determinación de polifenoles totales (TPC), flavonoides (TFC) y contenido total de antocianos (ACY).

- Determinación de polifenoles totales (TPC)

El contenido de compuestos fenólicos totales en las muestras de ambas bayas se evaluó mediante el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965). En un entorno de pH básico, los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, generando una coloración azul que se mide espectrofotométricamente a 760 nm. Este método no es específico para compuestos fenólicos, ya que mide la capacidad reductora de todas las sustancias presentes en las muestras. Por lo tanto, puede haber interferencias de otros componentes reductores presentes en los extractos, como ciertos aminoácidos, ácidos, azúcares o metales. A pesar de estas limitaciones, el método proporciona una visión general del contenido fenólico y de la capacidad antioxidante total de la muestra y es ampliamente utilizado para este fin (Prior, Wu y Schaich 2005).

Los polifenoles totales se determinaron a partir de los extractos hidroalcohólicos de mora y mortiño. En tubos eppendorf se colocaron 100 μL de la muestra, el blanco, o el patrón de ácido gálico, seguido de 500 μL del reactivo Folin Ciocalteu diluido al 10 % con agua destilada. Se incubaron las muestras durante 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 400 μL de Na_2CO_3 0,7 M a las muestras preincubadas, y se incubaron por segunda ocasión a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los resultados se obtuvieron por comparación con una recta preparada con ácido gálico (0,1875-0,75 mM) y se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de fruto seco.

- Determinación del contenido total de flavonoides (TFC)

El contenido total de flavonoides se determinó siguiendo la metodología descrita por Dewanto et al. (2002). En placas de 96 pocillos se colocaron 20 μL de la muestra, el blanco o el patrón de catequina, seguido de 100 μL de agua destilada y 6 μL de una solución de NaNO_2 al 5 %. Las placas fueron incubadas durante 6 minutos, en la oscuridad a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo se añadieron en cada pocillo 12 μL de una solución de AlCl_3 al 10 %. y se incubó durante 5 minutos más en las mismas condiciones. A continuación, se añadieron 40 μL de NaOH 1M y 22 μL de agua destilada. Finalmente, se midieron las muestras en el lector de placas a una absorbancia de 510 nm. Los resultados de concentración total de flavonoides se obtuvieron por comparación con la recta preparada con el patrón de catequina (20-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fueron expresados en mg de equivalentes de catequina por g de fruto seco.

- Determinación del contenido total de antocianos (ACY)

El contenido total de antocianos se determinó por el método de pH diferencial descrito por Pantelidis et al. (2007). Previo al ensayo, se elaboraron dos soluciones tampón: una de KCl 0,025 M a pH de 1 y la segunda de CH_3COONa 0,4 M a pH de 4,5. En cubetas de plástico se añadieron 100 μL de la muestra, el blanco o el patrón de cianidina y 900 μL de solución tampón de KCl . El proceso se repitió con las mismas proporciones en una segunda cubeta con el tampón 2.

Finalmente, se midieron ambas soluciones, para blanco/muestra/estándar, en el espectrofotómetro a una absorbancia de 500 y 700 nm respectivamente. El contenido de antocianinas monoméricas fue calculado como cianidina-3-glucósido de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2:

$$1) A = (A_{520} - A_{700})_{pH(1.0)} - (A_{520} - A_{700})_{pH(4.5)}$$

$$2) \frac{\text{mg de cianidina-3-glucósido}}{L} = \frac{(A \times PM \times FD \times 1000)}{\epsilon \times l}$$

donde (A) es el cambio en la absorbancia; (PM) masa molecular de cianidina-3-glucósido; (ϵ) coeficiente de extinción molar de cianidina-3-glucósido; (l) paso óptico de celda y (FD) factor de dilución. Los resultados se expresaron como miligramos de cianidina-3-glucósido por gramo de fruto seco.

3.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Los análisis de capacidad antioxidante se realizaron sobre los extractos hidroalcohólicos de las diferentes muestras empleando tres métodos diferentes: FRAP, ABTS y DPPH.

- Método FRAP

Se determinó la capacidad de captación de radicales libres mediante ensayo FRAP (poder antioxidante de reducción del hierro). Este método evalúa la capacidad de los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ion férrico a ion ferroso. Este proceso reductor se cuantifica mediante una reacción colorimétrica que involucra la adición de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). En un entorno de pH ácido, el TPTZ se une al ion ferroso formando un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm. El protocolo utilizado fue el descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas adaptaciones específicas.

El reactivo FRAP está compuesto por tricloruro de hierro 20 mM ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), tampón acetato (300 mM, pH 3,6) y 10 mM TPTZ disuelto en 40 mM HCl, (1:1:10, v/v/v). En una placa de 96 pocillos se colocaron 20 μL de la

muestra o el patrón y 180 μL de la solución FRAP, tras 6 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 593 nm, usando el reactivo FRAP como blanco. Los resultados se obtuvieron interpolando la absorbancia de las muestras en la recta de calibrado preparada con Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E) en metanol 75 %. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron en μmol de equivalentes Trolox (ET) por mg de fruto seco.

- Método ABTS

El ensayo ABTS/persulfato evalúa la capacidad de un compuesto para captar el radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Este radical se genera a partir del precursor ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), preparado a una concentración de 7 mM, al que se le añade persulfato de potasio 2,45 mM como agente oxidante para formar el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Re et al. 1999). Esta solución se mantuvo en la oscuridad 16 horas antes de la realización de la medida, tras este tiempo se diluyó con un volumen de PBS (pH 7,4) suficiente para alcanzar una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. La reacción se caracteriza por una reducción gradual de la coloración en la solución que contiene $\text{ABTS}^{\bullet+}$, a medida que las sustancias antioxidantes presentes en las muestras capturan este radical (Apak et al. 2013).

Metodológicamente, se adicionaron 50 μL de las muestras a analizar a 2 mL de la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$. La mezcla se agitó vigorosamente durante 10 segundos en un vortex, y luego de transcurridos 4 minutos, se procedió a medir la absorbancia a 734 nm. Los resultados se obtuvieron calculando la absorbancia de las muestras a partir de una recta de calibración preparada con Trolox. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y los resultados fueron expresados en μmol de equivalentes de Trolox (ET) por mg de fruto seco.

- Método DPPH

Siguiendo la técnica descrita por Bondet, Brand-Williams y Berset (1997) se determinó la capacidad de captación de radicales libres mediante el método de DPPH. Para preparar las muestras, se colocaron en una placa de 96 pocillos 110

μL de etanol 70 %, 80 μL de DPPH 0,2 mM y 10 μL de la muestra, el blanco o el patrón. Para preparar el blanco se reemplazó la muestra por etanol 70 %. Finalmente, se incubó la placa durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y se midió su absorbancia en el lector de placas a 517 nm. De igual manera que en el método FRAP y ABTS, los resultados se obtuvieron interpolando la absorbancia de las muestras en una curva de calibración preparada con Trolox. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y los resultados fueron expresados en μmol de equivalentes de Trolox (ET) por mg de fruto seco.

3.2.4 Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS

Los análisis se llevaron a cabo con un equipo Hewlett-Packard 1200, equipado con un inyector automático, una bomba binaria, un sistema de termostatación de columnas y un detector de diodos (DAD) en circuito integrado, dotado de una célula de flujo para altas presiones conectada a un espectrómetro de masas, acoplado a una estación de control y al procesamiento de datos HP ChemStation (versión A.05.04). Para el análisis por espectrometría de masas (MS), se utilizó un espectrómetro API 3200 Qtrap (Applied Biosystems), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo, que también puede funcionar como trampa iónica. El sistema estuvo conectado al software de procesamiento de datos Analyst 5.1.

Para el análisis de los compuestos fenólicos de mora y mortiño se prepararon nuevos extractos partiendo de 1 g de material liofilizado que fue extraído con 10 mL de una solución metanol-agua (80:20, v/v), acidificada con ácido clorhídrico al 0,1 %, en un baño de ultrasonidos durante 30 min. A continuación, los extractos se centrifugaron a 6700 *g* durante 5 min; el sobrenadante se recogía y el precipitado se sometía al mismo proceso otras tres veces. Las fases hidroalcohólicas obtenidas se reunían y se añadía una pequeña cantidad de agua ultrapura antes de proceder a concentrar el extracto, en evaporador rotatorio a 30 °C, hasta eliminar todo el metanol, obteniendo finalmente un extracto acuoso. Con el fin de eliminar los posibles azúcares y ácidos presentes en los extractos se llevó a cabo un proceso de purificación justo

antes de su inyección en HPLC, haciendo pasar los extractos brutos por cartuchos para extracción en fase sólida (SPE), Sep-Pak® de fase reversa C18. Una vez retenidos los compuestos fenólicos en el cartucho, éste se lavaba con un volumen de agua suficiente para eliminar los interferentes y posteriormente los compuestos de interés eran eluidos con una disolución de metanol: ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (95:5) y recogidos en un matraz de rotavapor, donde se añadía agua ultrapura antes de proceder a su concentración (30 °C), hasta sequedad total. Para el análisis de compuestos fenólicos no antocianicos, se pesaron 3 mg del extracto seco obtenido de cada muestra y se disolvieron en 1 mL de ácido fórmico al 0,1 %: acetonitrilo (70:30, v/v). Esta solución se diluyó antes de su análisis mediante HPLC-DAD-ESI/MS. Para el análisis de antocianos, se siguió el mismo procedimiento, pero en este caso los extractos secos se disolvieron en 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % : acetonitrilo (75:25, v/v).

- Análisis de fenoles no antocianicos.

Para la separación se empleó una columna Poroshell 120 EC-C18 (2,7 µm, 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a una temperatura de 35 °C. La fase móvil consistió en (A) ácido fórmico al 0,1 % en agua y (B) acetonitrilo, aplicándose el siguiente gradiente de elución: 0 % a 8 % B durante 5 minutos, 8 % a 10 % B durante 20 minutos, 10 % a 14,5 % B durante 20 minutos y 14,5 % a 60 % B durante 10 minutos, a un flujo de 0,5 mL/min. La detección se realizó mediante un detector DAD y un espectrómetro de masas (MS). Se utilizaron como longitudes de onda preferente para registrar los cromatogramas 280, 330 y 360 nm y se obtuvieron espectros UV-visible de los compuestos de interés en el rango de 220 nm a 600 nm. La detección por MS se llevó a cabo en modo negativo, registrando espectros de masas en el intervalo de m/z 100 a m/z 1400. Se utilizó aire Zero como gas nebulizador (40 psi), gas turbo (400 °C, 30 psi) para la eliminación del eluyente, nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión (en nivel medio). El detector se configuró para realizar dos análisis consecutivos: full scan de alta sensibilidad (Enhanced MS, EMS) y un análisis Enhanced Product Ion (EPI) para la fragmentación del ion original. Los parámetros para EMS fueron:

voltaje del capilar -4500 V, potencial de declusterización (DP) -40 V, potencial de entrada (EP) -7 V y energía de colisión (CE) -20 V. Por otro lado, los parámetros para EPI fueron: DP -40 V, EP -10 V, CE -25 V, y energía de colisión suplementaria (CES) 0 V.

- Análisis de antocianos

La separación se llevó a cabo utilizando una columna AQUA (Phenomenex) C18 (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm) termostata a una temperatura de 35 °C. La fase móvil estaba compuesta por (A) TFA al 0,1 % en agua y (B) acetonitrilo, con un gradiente de elución programado de la siguiente manera: fase isocrática 10 % B durante 5 min, 10 a 15 % B durante 15 min, isocrático 15 % B durante 5 min, 15 % a 18 % B durante 5 min, 18 % a 35 % B durante 20 min y 35 % a 60 % B durante 7 min, a un flujo de 0,5 mL/min. Se realizó una doble detección utilizando un detector DAD y un espectrómetro de masas (MS). La longitud de onda seleccionada para el registro de los cromatogramas fue de 520 nm, y se obtuvieron espectros UV-visible de los picos en el rango de 220 nm a 600 nm. La detección por MS se efectuó en modo positivo, registrando espectros de masas entre m/z 100 y m/z 900. Se utilizó aire Zero como gas nebulizador (50 psi) y como gas turbo (600 °C, 40 psi) para la evaporación del eluyente. Además, se empleó nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión (medio). El detector se configuró para realizar dos análisis consecutivos, EMS y EPI. Los parámetros establecidos para EMS fueron: voltaje del capilar 5000 V, DP 55 V, EP 4 V, y CE 10 V. Para EPI, los parámetros fueron: DP 55 V, EP 4 V, CE 10 V, y CES 0 V.

3.2.5 Preparación de placas Petri NGM (Nematode Growth Medium)

El medio NGM (Nematode Growth Medium) se prepara mezclando 6,8 g de agar, 1,2 g de NaCl y 1 g de peptona en 390 mL de H₂O destilada. A continuación, la mezcla se esteriliza durante 60 min en el autoclave. Justo antes de su uso, el medio NGM se atempera en un baño de agua a 60 °C durante 30 min y se enriquece con 400 μ L MgSO₄ 1 M, 400 μ L CaCl₂ 1 M, 400 μ L de colesterol (5 mg/mL etanol), 700 μ L de nistatina 1 % (1 g/100 mL en etanol : acetato de

amonio, 1:1), 400 µL de ampicilina sódica (50 µg/mL) y 10 mL de solución amortiguadora KPO₄ 1 M pH 6,0 (35,6 g K₂HPO₄ y 108,3 g KH₂PO₄ en 1 L de H₂O destilada), todos ellos previamente esterilizados en autoclave. Finalmente, el medio NGM se distribuye en placas Petri, de 90 mm de diámetro (20 mL) o de 35 mm de diámetro (5 mL), bajo condiciones estériles. Mantener una cantidad uniforme de agar en las placas minimiza la necesidad de reajustar el enfoque del microscopio al cambiar de una placa a otra. Las placas se enfrían a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar antes de la siembra. Posteriormente, pueden almacenarse en refrigeración a temperaturas entre 4 y 8 °C durante varios días.

3.2.6 Preparación *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento

El medio Agar LB, diseñado específicamente para el almacenamiento de colonias de *Escherichia coli*, se prepara mezclando 2 g de medio triptona, 1 g de cloruro sódico, 1 g de extracto de levadura, 3,4 g de agar y 200 mL de H₂O destilada. Igual que el medio NGM, se esteriliza en autoclave y se atempera bajo las mismas condiciones justo antes de su uso, añadiendo además 200 µL de ampicilina. El medio se reparte entre las placas Petri, en condiciones de esterilidad.

Con ayuda de un asa de siembra desechable se siembra *E. coli* OP50 a placas del medio Agar LB. Se utiliza la técnica de siembra por estría, con el fin de obtener colonias aisladas. Las placas se conservan en refrigeración a una temperatura entre 4 y 8 °C.

El cultivo de bacterias se realiza en el medio líquido L. Broth, preparado a partir de 5 g NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona, en 1 L de H₂O destilada. El pH se ajusta a un valor de 7,0 con NaOH 1 M y, por último, se autoclava la mezcla. Finalmente, se inocula una colonia aislada de *E. coli* OP50 en un Erlenmeyer (previamente autoclavado) que contiene 50 mL de medio líquido L. Broth, 50 µL de ampicilina, bajo condiciones de esterilidad. El cultivo se incuba a 37 °C durante toda la noche y, posteriormente, se almacena en alícuotas a 4 °C para facilitar su manejo, pudiendo conservarse así durante semanas.

A partir de estas alícuotas, se inoculan aproximadamente 200 μ L (placas Petri de 90 mm) y 20 μ L (placas Petri de 35 mm) en placas NGM estériles. Las placas inoculadas se secan a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar durante 30 min. Posteriormente, son incubadas durante 24 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se observa un césped bacteriano de OP50 viva sobre el que posteriormente se sembrarán los gusanos. Se procura que el césped bacteriano quede centrado en la placa, para evitar la dispersión de los gusanos y facilitar su visualización.

3.2.7 Sembrado de *C. elegans* en placas NGM

- Siembra de *C. elegans* en placas frescas

El procedimiento se realiza transfiriendo un trozo de agar con gusanos desde una placa de mantenimiento a una placa fresca, utilizando una espátula esterilizada. Los gusanos se desplazan del trozo de agar y se distribuyen por el césped bacteriano de la nueva placa.

- Transferencia de *C. elegans* individualmente

En algunas ocasiones, es necesario proceder a una transferencia individualizada de los nematodos. Para ello, el gusano se transfiere cuidadosamente de una placa a otra utilizando un asa de siembra, hecha de alambre de platino de calibre 32 insertado en una pipeta Pasteur a la que se redondeó su extremo más aplanado con una lima, eliminando los bordes afilados para evitar dañar tanto el agar como los gusanos. Antes de su uso, el asa de siembra es flameada para prevenir la contaminación.

Bajo la lupa con fuente de luz blanca, se realizó el proceso de transferencia. Para facilitar este proceso, se puede tomar una mínima cantidad de *E. coli* OP50 con el extremo del asa, lo que ayuda a que el gusano se adhiera más fácilmente. A continuación, el asa junto con el nematodo se apoya cuidadosamente en la nueva placa de agar permitiendo que el gusano se desprenda. Este procedimiento puede realizarse con varios gusanos a la vez.

- Transferencia de gran cantidad de *C. elegans*

El buffer M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 mL 1 M MgSO_4 , H_2O destilada hasta 1 L) previamente esterilizado, es fundamental para transferir gran cantidad de nematodos de unas placas a otras. Para ello, las placas se lavan en dos ocasiones con 3 mL de buffer M9, la suspensión obtenida se centrifuga durante 90 s a 4500 *g*, se elimina el sobrenadante y finalmente los gusanos son transferidos e incubados en nuevas placas de NGM agar.

3.2.8 Sincronización de *C. elegans*

La sincronización de la población de *C. elegans* se realiza para asegurar que todos los nematodos empleados en un ensayo específico tengan la misma edad o se encuentren en el mismo estado larvario. Para ello, los gusanos se dejan crecer durante 3-4 días en placas de agar NGM sembradas con OP50 y mantenidas a 20 °C, hasta que se obtenga una gran cantidad de huevos y/o hermafroditas con huevos en su interior.

Para llevar a cabo el proceso de sincronización, las placas con una población abundante de nematodos se lavan con 2 mL de buffer M9, repitiendo este proceso hasta reducir al mínimo la cantidad de gusanos restantes en la placa. La solución se recoge en tubos eppendorf y se centrifugan durante 1 min a 8000 rpm a 4 °C para evitar que los huevos eclosionen. A continuación, el sobrenadante es retirado de todos los tubos y sobre el residuo de gusanos y huevos se añaden 150 μL de una solución *bleaching* (preparada con 500 μL de NaOH 5N y 1 mL de lejía comercial), útil para desintegrar a todos los gusanos y larvas sin afectar a los huevos. Inmediatamente, la mezcla es agitada vigorosamente durante 10 min, alternando cada minuto un ciclo de agitación con vortex y un ciclo de reposo. Transcurrido este tiempo, la mezcla es centrifugada durante 1 min a 10.000 rpm a 4 °C y a continuación se elimina el sobrenadante. El pellet de huevos se lava cinco veces con buffer M9 para eliminar por completo los residuos de la solución *bleaching*. A continuación, se resuspenden los huevos en 1 mL de solución M9 y se transfieren a un tubo eppendorf nuevo. Esta solución se incuba a 20 °C en un dispositivo con agitación rotacional durante unas horas

para promover la eclosión. Después, los tubos se colocan en posición horizontal. Aproximadamente 24 horas después, las larvas habrán eclosionado y podrán ser transferidas a placas de agar NGM para continuar su desarrollo.

El volumen que se siembra en las placas de agar NGM dependerá de la concentración de huevos obtenida, y generalmente está entre 200 y 300 μL . Las placas se mantienen a 20 °C para permitir el completo desarrollo de los nematodos y su posterior uso.

En ocasiones, con cepas especialmente sensibles al proceso de *bleaching*, es necesario llevar a cabo un proceso de sincronización alternativo que consiste en tomar una cantidad conocida de gusanos hermafroditas con huevos en su interior, dejarlos en las placas de ensayo durante 1-2 horas y tras la puesta de los huevos retirar los gusanos adultos, asegurándose de recoger todos los nematodos que se habían colocado inicialmente.

3.2.9 Preparación de placas Petri para los ensayos con extractos de mora y mortiño

Para los ensayos de bioactividad de los extractos ricos en polifenoles de mora y mortiño se prepararon placas de agar NGM con dichos extractos. Para cada extracto se preparó una disolución madre (30-500 mg/mL) en DMSO, de la que se añadió un volumen adecuado al agar, previamente calentado en microondas y templado a 60 °C durante 20 minutos. Esto permitió obtener concentraciones finales de extracto en placa entre 30 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Todas las placas, incluidas las de control, contenían un 0,1 % (v/v) de DMSO para mantener la uniformidad.

3.2.10 Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente

El ciclo de vida de *C. elegans* es dependiente de la temperatura, existiendo una relación inversa entre la vida media del gusano y la temperatura de cultivo. Los ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente se han realizado para comprobar si los gusanos cultivados previamente en presencia de diferentes concentraciones de extractos ricos en compuestos fenólicos aumentan su

resistencia frente al estrés térmico. Se sabe que la termotolerancia está determinada en gran medida por la síntesis de proteínas de shock térmico (HSP) (Muñoz 2003). Estos ensayos se llevaron a cabo según el método descrito por Saul et al. (2009) con pequeñas modificaciones (Ayuda-Durán et al. 2019a; Ayuda-Durán et al. 2019b), como se describe a continuación.

En todos los casos se utilizó una población sincronizada de *C. elegans*. Las larvas N2 (cepa silvestre), así como las cepas mutantes estudiadas *daf-16(mu86)*, *hsf-1(sy441)* y *skn-1(zu67)* se sembraron en placas NGM de 90 mm de diámetro que contenían distintas concentraciones (30 a 500 µg/mL) de extractos de mora y mortiño (maduros e inmaduros). Las placas se incubaron a 20 °C hasta el día de realización del ensayo. Paralelamente, se realizan ensayos control en ausencia del extracto, pero con la misma concentración de DMSO (0,1 %).

La influencia del estrés térmico en la viabilidad del nematodo se evaluó en dos etapas de desarrollo. En el primer ensayo, los gusanos se mantuvieron a 20 °C en las placas de tratamiento o de control hasta alcanzar el segundo día de adulto, mientras que en el segundo ensayo permanecieron en las placas hasta el noveno día de adulto. En ambos casos, una vez alcanzado el día correspondiente de ensayo, los gusanos se transfirieron individualmente con un asa de siembra a placas de 35 mm de diámetro (20 gusanos por placa) y se sometieron a una temperatura de 35 °C durante 8 horas. Durante el ensayo, se contaron y registraron los nematodos supervivientes y los muertos a las 6 y 8 horas tras el inicio del estrés térmico. Se consideraba que los gusanos estaban muertos cuando no respondían a ningún estímulo como ligeros toques con el asa de siembra. Por cada tratamiento y control se realizaron tres ensayos independientes con 100 gusanos por ensayo.

3.2.11 Ensayos de longevidad

Se llevaron a cabo ensayos de longevidad utilizando la cepa silvestre N2 de *C. elegans* cultivada en presencia de los extractos de mora madura (100 µg/mL y 300 µg/mL en el medio de cultivo) e inmadura (100 µg/mL) y extractos de mortiño maduro e inmaduro (100 µg/mL en el medio de cultivo). Adicionalmente,

se incluyeron placas control que contenían el mismo porcentaje de DMSO (0,1 %) que las placas con los extractos fenólicos.

En todos los casos, los nematodos sincronizados en estado larvario L1 fueron transferidos a placas de agar NGM, de diámetro 90 mm, sembradas previamente con *E. coli* en las que se cultivaron a 20 °C hasta alcanzar el estado larvario L4.

El primer día de la etapa adulta, los gusanos se transfirieron individualmente a placas de 35 mm de diámetro (20 gusanos por placa) que contenían tanto los extractos objeto de estudio a diferentes concentraciones como FUdR 150 µM, para evitar la reproducción y la mezcla de generaciones. En paralelo se llevaron a cabo ensayos de longevidad en placas control con DMSO 0,1 % y FUdR.

Posteriormente, cada dos días, los gusanos se transferían a placas nuevas, que contenían también FUdR, *E. coli* y las diferentes concentraciones de extractos, o DMSO en el caso de las placas control. Durante toda la duración del ensayo, se realizaba el conteo de los nematodos cada uno o dos días y, al igual que en ensayos anteriores, eran considerados muertos aquellos animales que no respondían al toque suave con el asa de platino. Estos ensayos se llevaron a cabo con aproximadamente 100 gusanos por tratamiento y se realizaron en cada caso por triplicado.

3.2.12 Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa

Los gusanos se sembraron en placas NGM que contenían extracto de mora madura a una concentración de 300 µg/mL, y extractos de mora inmadura, mortiño maduro e inmaduro a una concentración de 100 µg/mL en el medio de cultivo. Al igual que en ensayos anteriores, se incluyeron placas control que contenían el mismo porcentaje de DMSO (0,1 %) que las placas con los extractos fenólicos. Se cultivaron durante cinco días a 20 °C, durante los cuales los gusanos se transferían al menos una vez a placas nuevas que contenían extractos de mora y mortiño, o con DMSO y *E. coli* como alimento.

El día del ensayo, los gusanos se recogieron de las placas con buffer M9; se realizaron dos lavados con el mismo buffer y el pellet se resuspendió en 300 µL de M9. El pellet resuspendido se transfirió a tubos Eppendorf de rosca, y se

añadieron 3,5 μ L de 2-mercaptoetanol y 350 μ L de buffer de lisis. Adicionalmente, se añadieron 10 bolitas de acero de 10 mm de diámetro, previamente esterilizadas. Las muestras se procesaron en un homogeneizador FastPrep a una velocidad de 5,5 m/s durante 7 ciclos de 10 segundos cada uno. Para cuantificar la cantidad de ARN se utiliza un espectrofotómetro Nanodrop.

El ADNc se sintetizó a partir de 2 μ g del ARN total obtenido de la extracción por medio de la transcripción reversa (RT) con el kit comercial High Capacity cDNA RT Kit Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific (Ayuda-Durán et al. 2024).

Para medir los niveles de expresión génica, se utilizó una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al. 1982). El análisis de PCR cuantitativa (RT-qPCR) fue realizado por el Servicio de Secuenciación de ADN de la plataforma Nucleus de la Universidad de Salamanca, utilizando el sistema BioMark™ HD y EvaGreen como método de detección. La cuantificación relativa del producto se basó en el ciclo umbral (Ct) durante la fase exponencial del proceso, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando *act-1* como gen de referencia (Livak y Schmittgen 2001). Para el análisis de la expresión de ARNm, se realizaron 9 experimentos independientes, confirmando la amplificación específica mediante la curva de disociación.

Los cebadores o "primers" específicos para el ADNc que codifica cada una de las proteínas a estudiar se obtuvieron de la literatura (*act-1*, *skn-1*, *daf-16*, *hsp16-2*) o se diseñaron utilizando el programa "OligoAnalyzer 3.1" de Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). La especificidad de estos *primers* se verificó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los *primers* utilizados fueron los siguientes:

act-1: CCAGGAATTGCTGATCGTATG (F) y GGAGAGGGAAGCGAGGATAG (R)
(Surco-Laos et al. 2011)

skn-1: AGTGTCGGCGTTCCAGATTTT (F) y GTCGACGAATCTTGCGAATCA (R)
(Martínez-Finley et al., 2014)

hsp-70: CAAGACTTTGGAGCCGGTTG (F) y GGAGCAGTTGAGGTCCCTTCCC (R)

age-1: TCCGTAAAGCCACAGGATTATG (F) y TGCCGTGGAGCTCTAATTTT (R)

gst-4: TGGAGAACAATTCGGTCAGTC (F) y TAAGCTTCTTCTCTGCAGTTT (R)

daf-2: AAGTCGATTCGGACGCTATTC (F) y GTACGGGCTCACTTCATTCTC (R)

sod-3: CGAGCTCGAACCTGTAATCAGCCATG (F) y
GGGGTACCGCTGATATTCTTCCACTTG (R) (Wei et al. 2014)

daf-16: CCAGACGGAAGGCTTAAACT (F) y ATTCGCATGAAACGAGAATG (R)
(Zhang, Lu y Zhou 2015)

hsp-16.2: CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC (F) y AGATTCGAAGCAACTGCACC (R)
(Zhang, Lu y Zhou 2015)

hsf-1: GAAATGTTTTGCCGCATTTT (F) y CCTTGGGACAGTGGAGTCAT (R) (Kern
et al. 2010)

daf-18: F ACATGCTGCGTCAGGATTAT (F) y AAGGAATTGTCCGATGGTACTT (R)

3.2.13 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software para PC SPSS (versión 23.0, SPSS Inc., Chicago). Se emplearon ANOVA de una vía y pruebas post hoc de Bonferroni para analizar estadísticamente los datos entre diferentes grupos. Los resultados y el error estándar se expresaron mediante un gráfico de barras agrupadas

Por otro lado, se utilizó ANOVA para comparaciones múltiples de valores para determinar posibles diferencias significativas entre los grupos tratados y de control en los ensayos de cuantificación de ARNm mediante qPCR. Para los estudios de longevidad, la supervivencia del animal se trazó usando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron los resultados mediante la prueba de log-rank. Finalmente, para la supervivencia al estrés térmico, se realizaron tablas de contingencia y se calculó la significación estadística usando el Chi Square Test. En cada análisis, se consideraron las diferencias estadísticamente significativas en el nivel de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

4.1.1 Caracterización de los extractos fenólicos del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

- Perfil fenólico

Se analizó la composición fitoquímica del mortiño recolectado a dos altitudes diferentes y en tres etapas de madurez, mediante HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. En todos los casos, los extractos de mortiño recogidos a 3641 (m.s.n.m.) durante las tres etapas de madurez presentaron concentraciones más altas de compuestos fenólicos que aquellos recolectados a menor altitud. El perfil fitoquímico de todos los extractos fue similar, independientemente del grado de madurez o la altitud (Figura.IV.1).

Es importante indicar que en los cromatogramas mostrados en la Figura.IV.1, la concentración inicial del extracto, así como el volumen de inyección fueron los mismos para todas las muestras. Aunque el objetivo de los cromatogramas que se muestran en la figura es comparar las diferencias entre los perfiles cualitativos en las distintas condiciones de recolección, hay que señalar que las áreas de los picos también son consistentes con las concentraciones de las moléculas.

La identificación tentativa de los picos se presenta en la Tabla.IV.1 y está basada en los iones (pseudo)moleculares y patrones de fragmentación MS². Los compuestos detectados corresponden a derivados hidroxicinámicos (3), antocianos (3) y flavonoles (8). Los flavonoles y los antocianos constituyen la mayoría de los compuestos fenólicos identificados en *V. floribundum* Kunth. Resultados de composición similares fueron reportados en la misma especie (Baenas et al. 2020; Cerrato et al. 2022; Vasco et al. 2009a) y en otras bayas pertenecientes al género *Vaccinium*, como *V. corymbosum* (Silva et al. 2017) y *V. myrtillus* (Ancillotti et al. 2017; Bujor et al. 2016; Pires et al. 2020).

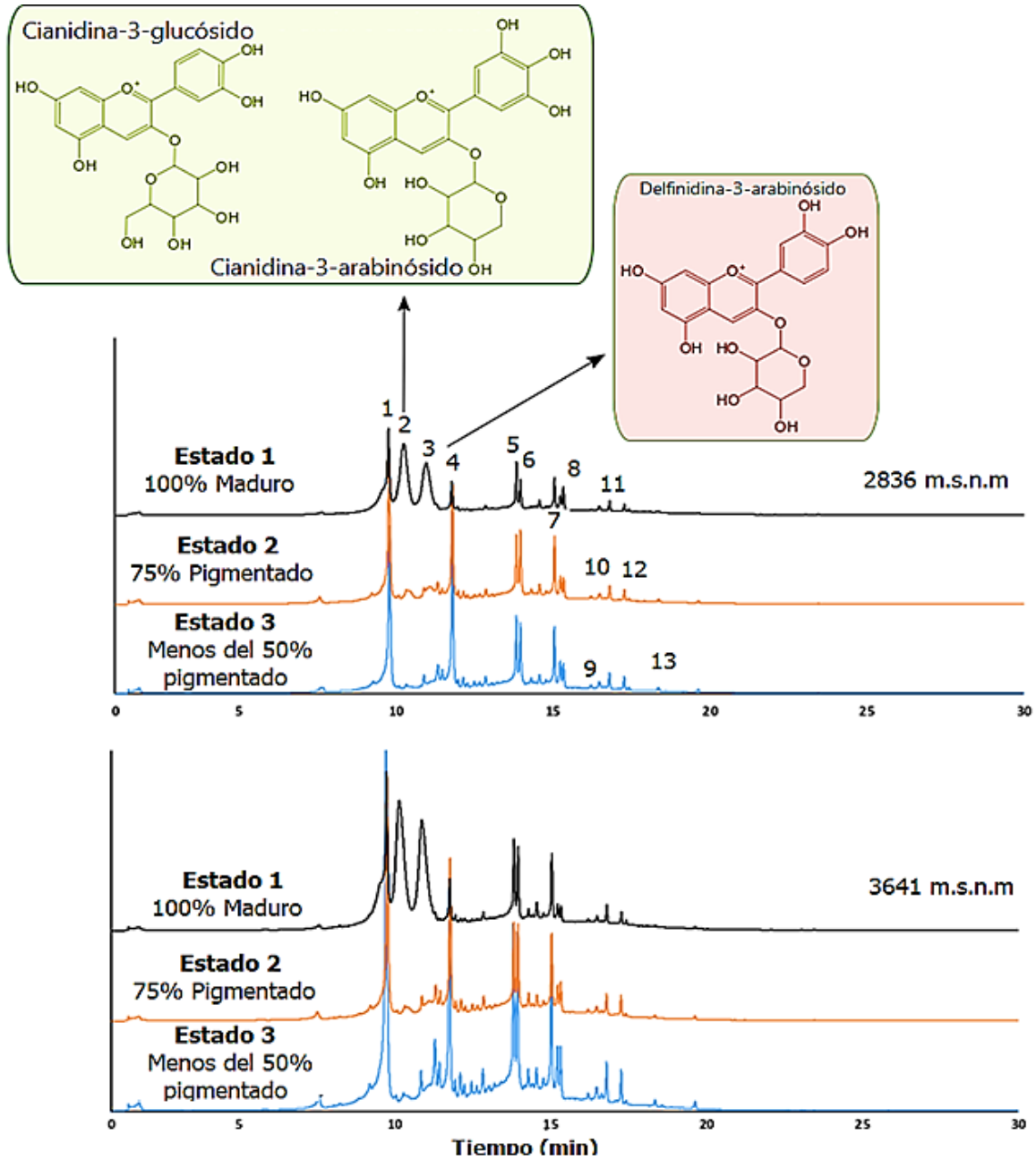


Figura.IV.1. Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 370 nm del extracto de mortiño andino silvestre (*V. floribundum* Kunth) recolectado a diferentes altitudes y etapas de madurez (azul: 50 % de madurez, naranja: 75 % de madurez y negro: 100 % de madurez). Las identidades de los picos numerados se recogen en la tabla IV.1.

Tabla.IV.1. Identificación tentativa de compuestos fenólicos de *V. floribundum* Kunth mediante HPLC-DAD-ESI/MS.

Pico	RT (min)	Ion pseudomolecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z) (Negativo)	Ion molecular [M] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z) (Positivo)	Identificación tentativa
1	9,8	353	191			Ácido cafeoilquínico
2	10,3	-	-	449	287	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido
		-	-	419	287	Cianidina-3- <i>O</i> -arabinósido
3	11,0	-	-	435	303	Delfinidina-3- <i>O</i> -arabinósido
4	11,8	335	179, 135			Ácido cafeoilsiquímico
5	13,8	433	323, 161, 221, 179			Cafeoilarbutina
6	14,0	463	301			Quercetin-hexósido
7	15,0	433	301			Quercetin-pentósido
8	15,3	447	301			Quercetin-rhamnósido
9	16,2	577	433, 475, 301			Quercetin-hidroximetilglutaril pentósido
10	16,5	475	433, 415			Quercetin-acetilpentósido
11	16,8	475	433, 415, 161			Quercetin-acetilpentósido
12	17,2	591	447, 489, 529			Quercetin-hidroximetilglutaril-rhamnósido
13	18,3	301	179, 151			Quercetina

El pico 1 posee un ion pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 353 y un patrón de fragmentación característicos de un ácido clorogénico (cafeoilquínico). Similarmente, las características del pico 4 ([M-H]⁻ de *m/z* 335) son coherentes con ácido cafeoilsiquímico. Ambos tipos de derivados hidroxicinámicos han sido ampliamente citados en *V. floribundum* y otras especies de *Vaccinium* (Baenas et al. 2020; Cerrato et al. 2022; Vasco et al. 2009a). Los picos 5 y 7 presentan el mismo ion [M-H]⁻ (*m/z* 433) pero distinto patrón de fragmentación. En el pico 5 los fragmentos MS² detectados, permiten la identificación como cafeoilarbutina (*p*-hidroxifenil 6-*O*-trans-cafeoil-β-D-glucopiranosido (Figura.IV.2), compuesto reportado en *Vaccinium dunalianum* (P. Zhao et al. 2008), en *Disterigma*

alaternoides, un tipo de arándano andino (Aita et al. 2021) y también recientemente en *V. floribundum* (Cerrato et al. 2022). En el estudio realizado por Aita et al. (2021) sobre *Disterigma alaternoides* se señala la cafeoilarbutina como el derivado hidroxicinámico individual más abundante, siendo en general los conjugados de arbutina los derivados de ácidos fenólicos mejor representados en estas bayas. De acuerdo con Baenas et al. (2020), los derivados hidroxicinámicos representan el 15,7 % del total de compuestos fenólicos en *V. floribundum*, estando representados principalmente por ácidos cafeoilquínicos.

Se ha descrito que la cafeoilarbutina es eficaz en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y posee propiedades blanqueadoras de la piel (Aita et al. 2021). Igualmente, se han asociado a ácido cafeico y derivados diversas actividades biológicas, como antiinflamatoria, anticancerígena y antibacteriana, así como capacidad antioxidante (da Silva Rosa Bonadiman et al. 2021; Samad et al. 2014).

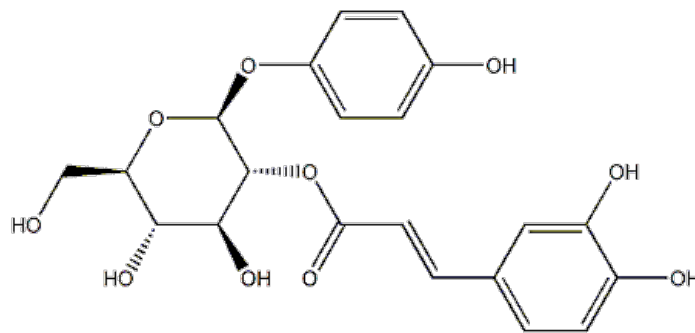


Figura IV.2. Estructura química de cafeoilarbutina.

Los restantes compuestos fenólicos identificados en mortiño corresponden a flavonoides, en particular flavonoles y antocianos. Los picos 6, 7 y 8 se caracterizan por la presencia en su espectro MS² de un fragmento de m/z 301, lo que permite asociarlos a derivados de quercetina unidos a distintos restos de azúcar (hexosa, pentosa, rhamnosa), mientras que el pico 13 corresponde al aglicón quercetina. Como se ha indicado anteriormente, el pico 7 presentaba un ion [M-H]⁻ de m/z 433, idéntico al del pico 5, pero a diferencia de éste, en su patrón de fragmentación no se observaban fragmentos característicos de derivados de ácido cafeico (179, 135), sino que aparecía un único fragmento de

m/z 301, lo que permite su identificación tentativa como un pentósido de quercetina. Todos los derivados de quercetina anteriores han sido previamente descritos en *V. floribundum* u otras especies de *Vaccinium* (Ancillotti et al. 2017; Baenas et al. 2020; Pires et al. 2020; Vasco et al. 2009a).

El pico 12 ($[M-H]^-$ de m/z 591) origina un fragmento MS^2 de m/z 447 por pérdida de 144 uma que podría corresponder a un resto hidroximetilglutárico. Un compuesto con estas características fue previamente descrito en *V. myrtillus* (Bujor et al. 2016) y *V. meridionale* (Garzón et al. 2020) e identificado como quercetina-hidroximetilglutaril-rhamnósido, identidad que se propone para este pico. Igualmente, el pico 9 ($[M-H]^-$ de m/z 577) libera un fragmento MS^2 de m/z 433 por la pérdida de 144 uma, por lo que podría asociarse a un quercetin-hidroximetilglutaril-pentósido. Finalmente, los picos 10 y 11 ($[M-H]^-$ de m/z 475) liberan un fragmento MS^2 de m/z 433, que supone la pérdida de 42 uma, característico de un resto acetilo, por lo que podrían corresponder a quercetin-acetilpentósidos, aunque dado el pequeño tamaño de estos picos no se pudo obtener un espectro UV-vis lo suficientemente claro para confirmar si se trata de flavonoles. La importancia de los derivados de quercetina en la composición del mortiño andino se ha puesto de manifiesto en estudios previos, donde se estimó que aproximadamente el 97 % del área total de los picos de los flavonoles correspondía a este tipo de derivados (Cerrato et al. 2022)

Los picos 2 y 3 corresponden a antocianos identificados en base a sus espectros de masas como los 3-*O*-glucósidos y 3-*O*-arabinósidos de cianidina (solapados en el pico 2) y 3-*O*-arabinósido de delphinidina (pico 3), compuestos ampliamente descritos en bayas de *Vaccinium* (p.ej. Ancillotti et al. 2017; Faria et al. 2005; Pires et al. 2020; Vasco et al. 2009a). Estudios anteriores sobre *V. floribundum* Kunth determinaron que los derivados de cianidina son, con diferencia, los antocianos predominantes (70-80 %) en esta especie, seguidos por los derivados de delphinidina (15-19 %) (Baenas et al. 2020; Cerrato et al. 2022; Esquivel-Alvarado et al. 2020). No se han detectado, sin embargo, derivados de pelargonidina, frecuentes en otras bayas. Un resultado similar fue obtenido por Vasco et al. (2009a), quienes indican que los glicoconjugados de

pelargonidina y malvidina están presentes en otras especies del género *Vaccinium* pero no en *V. floribundum* Kunth.

En la Figura.IV.1 se puede observar que la abundancia de antocianos es mucho mayor en la etapa 1 (nivel más alto de madurez), como también se puede comprobar en los resultados de cuantificación de estos pigmentos (Tabla.IV.2). La acumulación de cianidinas y delfinidinas se ha relacionado con el color púrpura oscuro de las bayas, cuyos contenidos están influidos por el estado de madurez de los frutos y sus condiciones de crecimiento. También se ha demostrado que factores ambientales como la irradiación solar, la diferencia entre las temperaturas diurnas y nocturnas, y la intensidad de la luz solar directa influyen en la acumulación de antocianos (Zoratti et al. 2014), lo que contribuye a la mayor concentración de estos pigmentos determinados en el mortiño recolectado a mayor altitud (Figura.IV.1 y Tabla.IV.2.).

- Determinación de polifenoles (TPC), flavonoides (TFC) y antocianinas (ACY) totales

Diversos estudios han analizado la composición fenólica y la capacidad antioxidante del mortiño andino (*V. floribundum* Kunth) (Alarcón-Barrera et al. 2018; Vasco et al. 2009b). Sin embargo, en nuestro conocimiento, no se han realizado investigaciones sobre la influencia de la altitud, junto con el estado de madurez del fruto, en la composición y concentración de compuestos fenólicos, así como en las actividades biológicas del mortiño silvestre.

En la Tabla.IV.2 se muestran los resultados obtenidos para los contenidos de polifenoles, flavonoides y antocianos totales, determinados por métodos fotométricos, en muestras recolectadas a dos altitudes y 3 estados de madurez. En la Figura.IV.3 se realizan comparaciones múltiples de los contenidos totales de polifenoles, flavonoides y antocianos entre las muestras de mortiño recolectadas en distintas etapas de madurez a diferentes altitudes.

El contenido de polifenoles totales (TPC) se analizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC), basado en el cambio de color producido al reducirse el

reactivo de FC (una mezcla de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico) en medio alcalino, dando lugar a una coloración azulada que se mide colorimétricamente. Se trata de un método ampliamente utilizado para la determinación de polifenoles totales, aunque en realidad lo que mide es la capacidad reductora de la muestra, ya que el reactivo de FC no solo reacciona con los compuestos fenólicos, sino también con aminoácidos, péptidos, azúcares reductores, ácido ascórbico y otros compuestos reductores que puedan estar presentes. Por lo tanto, la interpretación de esta prueba no puede asociarse exclusivamente al contenido de polifenoles, sino a la capacidad reductora total de los diferentes componentes de la muestra (Huang, Boxin y Prior 2005). En todo caso, cabe suponer que los polifenoles constituyen la fracción principal de sustancias antioxidantes presentes en los extractos obtenidos. Los resultados suelen expresarse en equivalentes de ácido gálico (GAE).

Tabla.IV.2. Contenidos de polifenoles, flavonoides y antocianos totales en el mortiño (*V. floribundum* Kunth) según la altitud del sitio de recolección y la etapa de madurez del fruto.

Parámetros	Altitud	Estado de madurez			p-valor (Estado)
		Estado 1 [◊]	Estado 2 [◊]	Estado 3 [◊]	
<i>TPC</i> (mg GAE/100 g PS) ¹	3641 (m.s.n.m)	45,1 ± 4,1	38,4 ± 2,8	60,1 ± 2,3	< 0,001
	2836 (m.s.n.m)	24,1 ± 5,8	29,4 ± 3,3	32,0 ± 4,3	0,72
<i>p-valor (Altitud)</i>		0,017	0,04	0,001	
<i>TFC</i> (mg Cateq/g PS) ¹	3641 (m.s.n.m)	2,3 ± 1,8	2,5 ± 1,5	3,8 ± 1,2	< 0,001
	2836 (m.s.n.m)	1,3 ± 0,5	1,9 ± 1,2	2,1 ± 0,8	0,01
<i>p-valor Altitud)</i>		0,006	0,021	0,051	
<i>ACY</i> (mg Cy Eq/g PS) ¹	3641 (m.s.n.m)	3,5 ± 0,3	1,3 ± 0,06	0,6 ± 0,05	< 0,001
	2836 (m.s.n.m)	2,5 ± 0,09	1,7 ± 0,04	0,1 ± 0,04	< 0,001
<i>p-valor (Altitud)</i>		< 0,001	0,05	0,06	

¹Los resultados se expresan como media ± DE.

[◊](Etapa 1: completamente maduro; etapa 2: 75 % pigmentado, y etapa 3: menos del 50 % pigmentado). TPC: Contenido de polifenoles totales; TFC: Contenido de flavonoides totales; ACY: Contenido de antocianos totales.

En la Tabla.IV.2 se puede comprobar que los niveles más altos de polifenoles totales se encontraron en las bayas recolectadas a mayor altitud dentro de cada etapa de madurez. El mayor valor de TPC corresponde a los frutos completamente maduros recolectados en la región de Imbabura (3641 m.s.n.m.) y el menor a los de la región de Carchi (2836 m.s.n.m.). Estos hallazgos coinciden con estudios previos sobre *V. floribundum* Kunth (Llvisaca-Contreras et al. 2022) y otra especie de *Vaccinium*, como *V. glaucoalbum* (Feng et al. 2017) o *V. corymbosum* L. (Spinardi et al., 2009, 2019) , donde se describen patrones similares en cuanto a la composición de compuestos fenólicos, con concentraciones más altas a mayores altitudes. Por otra parte, la altitud no sólo influye sobre el contenido de polifenoles totales sino que también puede afectar de manera diferente a la concentración de clases individuales de compuestos fenólicos, como se ha observado en fresas (Guevara-Terán et al. 2022).

Un estudio realizado en China determinó que un aumento en la altitud de 2000 a 3500 m.s.n.m. producía una elevación en el contenido de ácidos fenólicos, especialmente ácido cafeico (Zheng et al. 2011). Estos resultados serían coherentes con los obtenidos en nuestro estudio, donde se observa un incremento de los picos 1, 4 y 5, todos ellos derivados del ácido cafeico, en las muestras recolectadas a mayor altura (Figura.IV.1) respecto a las cultivadas en zonas más bajas. Se ha sugerido que los derivados del ácido cafeico son eficaces eliminadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) y absorbentes de radiación UV, ya que contribuyen al engrosamiento de la pared celular, proporcionando protección adicional contra la penetración de la radiación UV (Agati et al. 2013). Por otra parte, en bayas del género *Vaccinium* se ha descrito también una disminución en los niveles de ácidos hidroxicinámicos en etapas avanzadas de desarrollo del fruto y una mayor concentración en frutos inmaduros a altitudes elevadas (Moretti et al. 2010). Estas observaciones coinciden con los resultados aquí presentados, donde se observan diferencias en los niveles de estos compuestos entre las etapas de madurez 1 y 3 a mayor altitud (Figura. IV.3A).

En cuanto al contenido de flavonoides totales (TFC), el promedio en la etapa de madurez 3 (frutos inmaduros) fue significativamente mayor que el observado en bayas completamente maduras (Tabla.IV.2; Figura.IV.3B), tanto

en las muestras recolectadas a 2836 m.s.n.m. como en las procedentes de zonas con mayor altitud, lo que sugiere que el TFC disminuye a medida que avanza el proceso de maduración del fruto. Estos resultados coinciden con hallazgos previos en *V. floribundum* Kunth (Llvisaca-Contreras et al. 2022; Spinardi et al. 2019), *V. corymbosum* L. (Campra et al. 2019) y *V. vitis idaea* L. (Nilova et al. 2021), así como en otros tipos de bayas (Rieger et al. 2008; Zeng et al. 2020). Se ha indicado que los flavonoides desempeñan múltiples roles en fotoprotección, y se hipotetiza que su acumulación en la planta es eficaz para inhibir la generación de especies reactivas de oxígeno y reducir las ya formadas en respuesta al estrés causado por altos niveles de radiación luminosa (asociada con altitudes elevadas), lo que justificaría los resultados obtenidos en este trabajo donde se ha observado que el contenido de flavonoides totales, en similar estado de madurez, siempre fue significativamente superior en las muestras recolectadas a mayor altitud. Agati et al. (2013) recogen que una mayor tasa de irradiación estimula la biosíntesis de flavonoides como quercetina y luteolina sin afectar de manera similar a otros flavonoides como kaempferol y apigenina.

Es importante destacar que la altitud no solo influye positivamente en el momento fenológico del fruto, sino también en su dinámica de maduración (Zeng et al. 2020). Parámetros ambientales, como la temperatura (que disminuye con la altitud) y la radiación fotosintéticamente activa (que aumenta con la altitud) juegan un papel crucial en la maduración completa de las bayas (Huang, Boxin y Prior 2005). Todo ello concuerda con nuestras observaciones sobre las condiciones ambientales en las localidades donde se recolectaron los arándanos andinos silvestres (Tabla III.2), y explicaría las notables diferencias en los contenidos de flavonoides totales entre las etapas de madurez 3 y 1 a mayor altitud. Así, se encontró una disminución significativa en los valores de TFC cuando las bayas comienzan a madurar, pasando de una pigmentación verde/rojiza (menos del 50 %) a una baya casi completamente pigmentada (más del 75 %), y finalmente a una baya completamente madura (Tabla.IV.2; Figura.IV.3B).

Durante la maduración de las bayas, ocurren numerosos cambios bioquímicos complejos que resultan en el agrandamiento celular, el

endulzamiento, el ablandamiento y la pigmentación del fruto. En las primeras etapas de maduración, los compuestos predominantes son carotenoides y clorofilas, así como compuestos fenólicos de naturaleza flavonoide, como flavonoles y flavanoles. A medida que progresa la maduración se produce una degradación en las clorofilas y disminuyen también las concentraciones de flavonoles y flavanoles (Huang, Boxin y Prior 2005; Vaneková et al. 2020), mientras que aumenta la acumulación de antocianos, convirtiéndose en los principales flavonoides en las bayas maduras (Zoratti et al. 2015). Este cambio conduce a la transición de la pigmentación de verde a morado. Los antocianos se encuentran tanto en la pulpa de la baya como, predominantemente, en su piel. A medida que el fruto madura, su contenido varía y también se modifica el perfil antociánico, que es variable según el tipo de baya. Así, por ejemplo, la mora o la grosella contienen solo entre 5 y 8 antocianos diferentes, mientras que los distintos tipos de arándano presentan entre 13 y 27 compuestos diferentes, dependiendo del genotipo (Riihinen et al. 2008). Nuestros resultados concuerdan con la tendencia descrita, ya que las concentraciones de antocianos (ACY) en las etapas de madurez 2 y 3 fueron bajas en ambas altitudes, para aumentar de manera importante en la fase de mayor madurez (estado 1). Igualmente, la altitud y las condiciones ambientales de cada sitio de producción influyen de manera determinante sobre el contenido antociánico, con niveles significativamente mayores a 3641 m.s.n.m. en comparación con 2836 m.s.n.m. en todas las etapas de madurez (Tabla.IV.2; Figura.IV.3C).

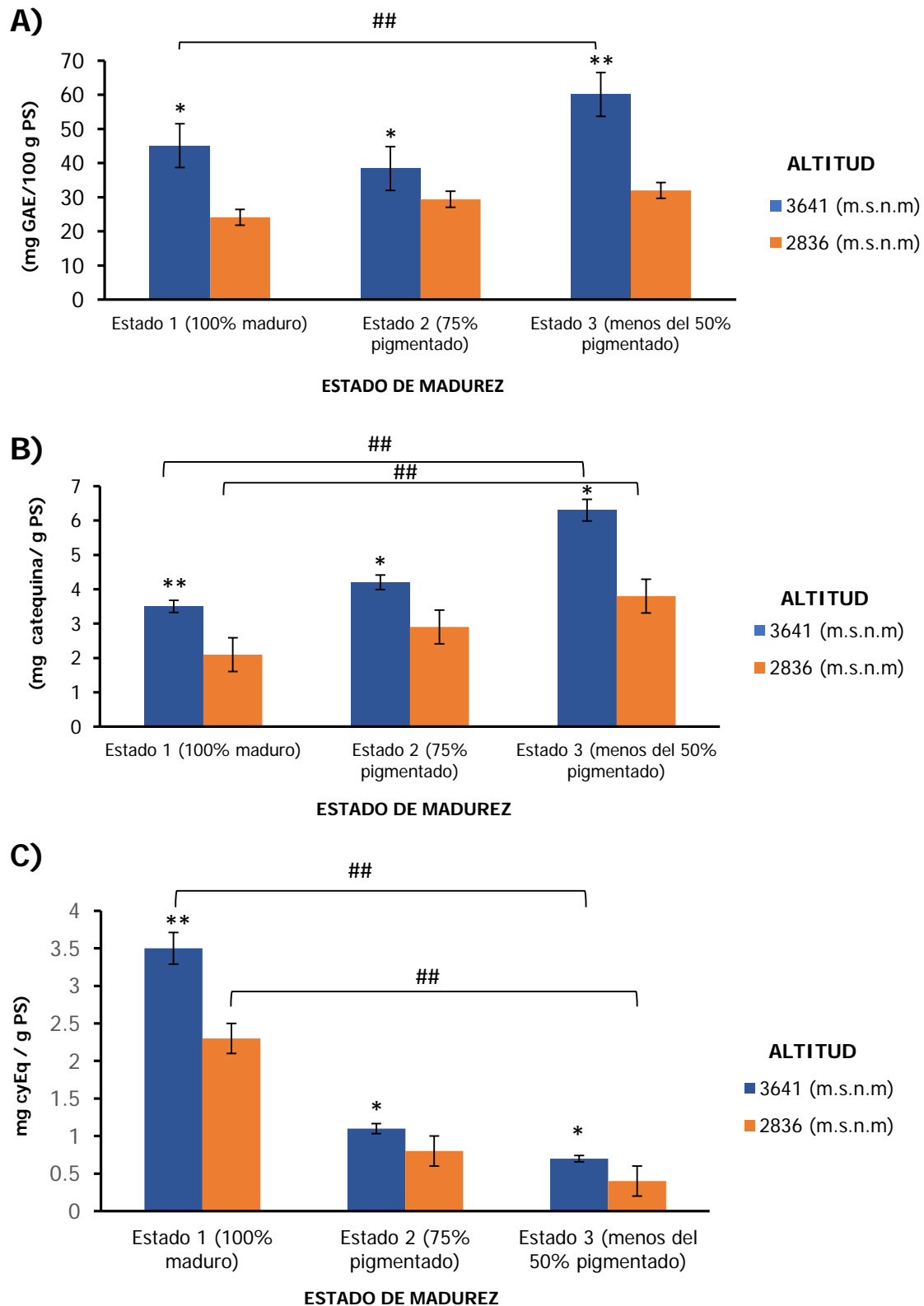


Figura.IV.3. Comparaciones múltiples de la composición fenólica del mortiño (*V. floribundum* Kunth) con respecto a tres etapas de madurez basadas en su pigmentación (Estado 1: completamente maduros, estado 2: 75 % completamente pigmentados y estado 3: menos del 50 % pigmentados) en muestras recolectadas a alta (3641 m.s.n.m.) y baja (2836 m.s.n.m.) altitud. (A) Polifenoles totales, (B) contenido total de flavonoides y (C) contenido total de antocianos. Los resultados se expresan como media \pm DE de tres experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, diferencias significativas en comparación con la altitud baja; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, diferencias significativas entre los grupos de etapas de madurez a baja y alta altitud.

Estudios realizados en otras especies como *Vaccinium glaucoalbum* (Feng et al. 2017) y *V. uliginosum* (Wang et al. 2014) también encontraron un alto contenido de ACY en frutos recolectados a mayores altitudes. En un estudio realizado con *V. corymbosum* L. en el norte de Italia se encontró que la concentración total de antocianos aumentaba hasta 34 veces durante el proceso de maduración en las bayas cultivadas a altitudes elevadas (Alpes), mientras que en las de altitudes bajas el incremento era solo de 25 veces (Spinardi et al. 2019). Este fenómeno podría ser debido a un mecanismo de protección de las plantas frente a las condiciones ambientales extremas en sitios de gran altitud (Rieger et al. 2008; Wang, Li, y Bi 2018). La acumulación de antocianos en las bayas está también influida por la temperatura, un factor ambiental crucial, pero a menudo subestimado en la composición química final del fruto (Del-Castillo-Alonso et al. 2016; Timmers et al. 2017), habiéndose indicado que las temperaturas diurnas más altas durante la maduración son un factor determinante en la acumulación de antocianos en las bayas (Spinardi et al. 2009). Asimismo, factores como la proporción de materia seca, niveles de azúcares y ácidos orgánicos o contenido de aceite del fruto parecen también jugar un papel en esta acumulación (Moretti et al. 2010).

4.1.2 Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos fenólicos del mortiño

La Tabla IV.3 muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de arándanos andinos silvestres utilizando dos métodos diferentes (FRAP y DPPH). Se puede observar que las muestras recolectadas en la etapa de madurez 3 a mayor altitud fueron las que presentaron los mayores valores de capacidad antioxidante en ambos ensayos, existiendo diferencias significativas entre las muestras recogidas en distintas fases de maduración y siendo en el estado 2 donde se encontraron los valores más bajos (Figura IV.4). No se observaron, sin embargo, diferencias significativas entre las distintas etapas de madurez en las bayas recogidas en altitud más baja, lo cual es coherente con el contenido en polifenoles totales

(TPC) anteriormente comentado, donde tampoco se encontraron diferencias significativas en esas muestras (Tabla IV.2). En general, el poder antioxidante/reductor aumentó con la altitud y disminuyó conforme el fruto maduraba, mientras que los valores se mantuvieron estables en las distintas etapas de madurez en la altitud más baja. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos para el TPC y el TFC (Tabla IV.2).

Tabla.IV.3. Capacidad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) recolectado a diferentes altitud y estado de madurez.

Parámetros	Altitud	Estado de madurez			p-valor (Estado)
		Estado 1 [◇]	Estado 2 [◇]	Estado 3 [◇]	
FRAP ($\mu\text{mol TEq/g PS}$) ¹	3641 (m.s.n.m)	186,9 \pm 19,9	141,5 \pm 5,9	230,2 \pm 14,7	0,001
	2836 (m.s.n.m)	111,9 \pm 6,5	102,8 \pm 8,1	111 \pm 5,7	0,273
p-valor (Altitud)		0,003	0,003	0,001	
DPPH ($\mu\text{mol TEq/g PS}$) ¹	3641 (m.s.n.m)	263,3 \pm 1,1	208,1 \pm 3,4	284,9 \pm 1,4	< 0,001
	2836 (m.s.n.m)	170,7 \pm 17,7	168,6 \pm 18,1	166,1 \pm 24,6	0,963
p-valor Altitud)		0,001	0,021	0,001	

¹ Resultados expresados en μmol de equivalentes Trolox por g de extracto seco de muestra como media \pm DE. FRAP: Ensayo de poder reductor/antioxidante férrico, DPPH: Método de 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazilo.

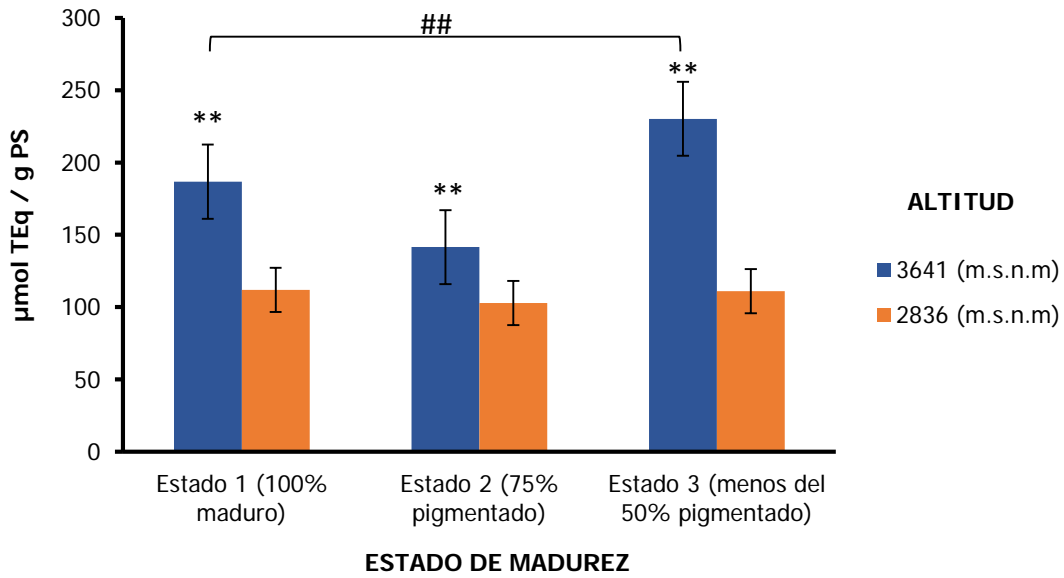
[◇](Estado 1: fruto completamente maduro; estado 2: 75 % pigmentado, y estado 3: menos del 50 % pigmentado).

Los resultados obtenidos coinciden con los de otros estudios sobre capacidad antioxidante realizados en la misma especie recolectada en la región andina ecuatoriana (Alarcón-Barrera et al. 2018; Pfenninger et al. 2002). La mayor capacidad antioxidante encontrada en los frutos recolectados a altitudes elevadas podría estar relacionada con las condiciones climáticas de esas zonas, como consecuencia de la mayor exposición a la radiación solar (Spinardi et al. 2019; Viskelis et al. 2009), como ya se ha comentado al discutir los resultados encontrados para polifenoles y flavonoides totales. Se ha sugerido que esto puede interpretarse como una respuesta reguladora protectora, frente al estrés producido por la mayor tasa de radiación UV que conduciría a aumentar la capacidad antioxidante, proceso que podría ser considerado como "estrés

positivo" en lugar de "estrés destructivo" (Nilova et al. 2021). Observaciones similares se han realizado en frambuesas y fresas, donde frutos de cultivos orgánicos mostraban mayor actividad antioxidante debido a su mayor exposición a estrés ambiental en comparación con cultivos tradicionales (Horanni y Engelhardt 2013; Leung 2015).

Las variaciones en la capacidad antioxidante según la etapa de madurez de los frutos se han relacionado con el contenido de compuestos bioactivos en las diferentes etapas de desarrollo de las bayas (Yobi et al. 2020). En el caso de las muestras de mortiño estudiadas se puede suponer una relación con el contenido de polifenoles totales, como también se ha sugerido por otros autores. Así, por ejemplo, en un estudio sobre cinco variedades de arándanos coreanos se encontró que la actividad antioxidante era mayor en frutos inmaduros, existiendo una correlación directa con los niveles de flavonoides y fenoles totales (Zoratti et al. 2014). Otro grupo de investigación reportó una fuerte correlación positiva entre el TPC y la actividad antioxidante en muestras de *V. myrtillus* de diferentes regiones geográficas, mientras que la correlación con los antocianos (ACY) fue menor (Åkerström et al. 2010).

A) Ensayo FRAP



B) Ensayo DPPH

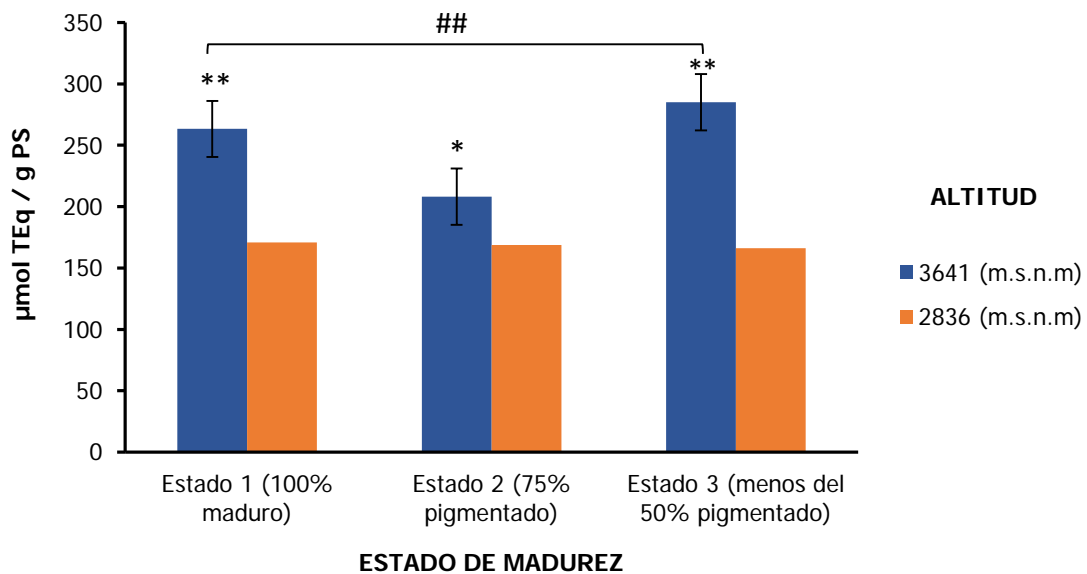


Figura.IV.4. Comparaciones múltiples entre la capacidad antioxidante del mortiño (*V. floribundum* Kunth) en tres etapas de madurez basadas en su pigmentación (Estado 1: completamente maduros, estado 2: 75 % completamente pigmentados y estado 3: menos del 50 % pigmentados) en muestras recolectadas a alta (3641 m.s.n.m.) y baja (2836 m.s.n.m.) altitud. (A) Ensayo FRAP, y (B) ensayo DPPH. Los resultados se expresan en μmol de equivalentes Trolox por g de extracto seco de muestra como media \pm DE de tres experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, diferencias significativas en comparación con la altitud baja; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, diferencias significativas entre los grupos de etapas de madurez a baja y alta altitud.

4.2 Mora andina (*Rubus glaucus* Benth)

4.2.1 Caracterización de los extractos fenólicos de la mora andina (*Rubus glaucus* Benth)

- Perfil fenólico

La mora andina (*Rubus glaucus* Benth) es una fuente natural de compuestos fenólicos, entre los cuales flavonoles y antocianos son las clases predominantes, seguidos por ácidos fenólicos, principalmente hidroxicinámicos, y taninos hidrolizables (derivados de los ácidos elágico y gálico) (Carrillo-Perdomo et al. 2015; Vasco et al. 2009c).

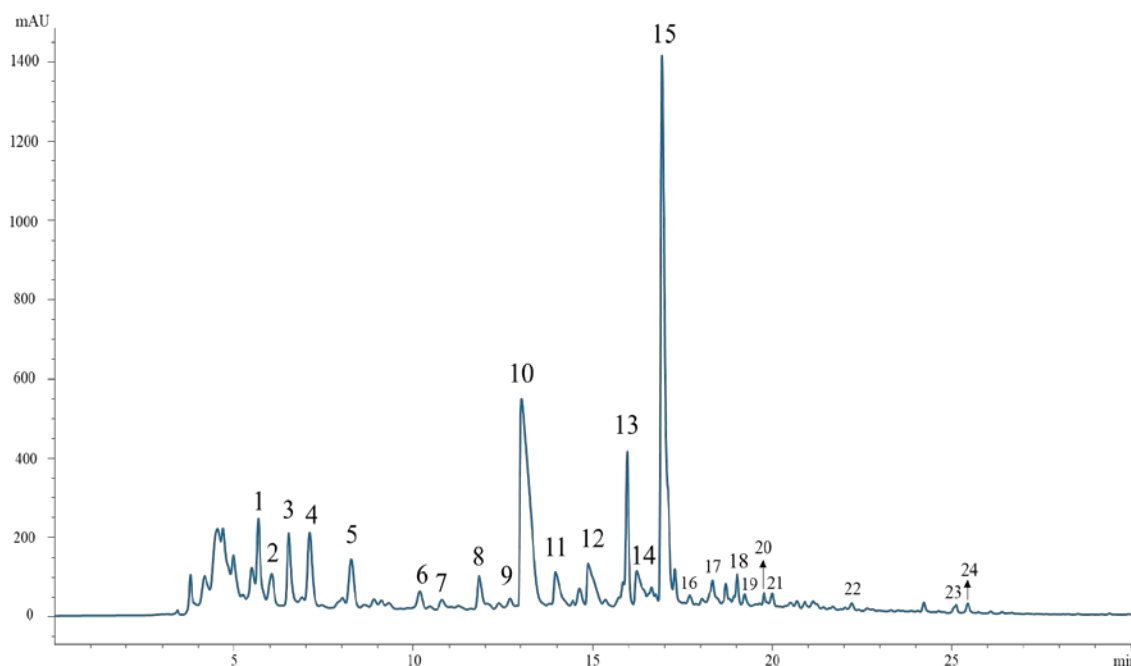


Figura.IV.5. Cromatograma de HPLC-DAD registrado a 330 nm de un extracto de mora inmadura (*Rubus glaucus* Benth)

En el presente estudio se identificaron tentativamente 30 compuestos: 9 flavonoles y 5 ácidos fenólicos, junto con derivados del ácido elágico (6) y elagitaninos (5), y antocianos (5) (Tablas IV.4 y IV.5). Los cromatogramas representativos, obtenidos a 330 y 520 nm, se muestran en las Figuras IV.5 y IV.8. Para la identificación tentativa de los picos se tuvieron en cuenta tanto los tiempos de retención, como el espectro UV-Vis y de masas, así como el patrón

de fragmentación en el MS^2 . El perfil fitoquímico cualitativo fue similar en todos los extractos, independientemente de la altitud o el estado de madurez.

Tabla.IV.4. Identificación tentativa de compuestos fenólicos detectados en *Rubus glaucus* Benth mediante HPLC-DAD-ESI/MS.

Pico	RT (min)	Ion Pseudomolecular [M-H] ⁻ (m/z)	Principales fragmentos MS ² (m/z)	Identificación tentativa
1	5,9	633	301	Galoil-HHDP-glucosa
2	6,2	633	301	Galoil-HHDP-glucosa
3	6,6	935	633, 301	Galoil-bis-HHDP-glucosa
4	7,1	323	161 [138 + 23 uma]	<i>p</i> -Hidroxibenzoil-glucósido
5	8,3	325	163, 145	<i>p</i> -Cumaroil-glucósido
6	10,2	193	135	Ácido ferúlico
7	10,9	355	179, 161	Glucurónido de ácido cafeico
8	11,8	197		Ácido siríngico
9	12,8	935	467, 301	Galoil-bis-HHDP-glucosa
10	12,9	935		Galoil-bis-HHDP-glucosa
11	13,9	433	301	Pentósido de ácido elágico
12	14,9	433	301	Pentósido de ácido elágico
13	16,0	609	301	Quercetin-rutinósido
14	16,2	301	257, 229, 185	Ácido elágico
15	17,0	477	301, 179, 151	Quercetin-glucurónido
		463	301,179, 151	Quercetin-glucósido
16	18,1	433	301, 271, 179	Pentósido de ácido elágico
17	18,4	505	463, 301	Quercetin-acetilglucósido
18	19,0	433	301, 271, 179	Quercetin-pentósido
19	19,3	461	285	Kaempferol-glucurónido
20	19,8	447	315, 301	Pentóxido del ácido metilelágico
21	19,9	475	301	Acetilpentósido del ácido elágico
22	21,2	463	301	Hexósido de quercetina
23	24,4	517	301	Quercetin-malonilpentósido
24	25,5	301		Quercetina

Los flavonoles (picos 13, 15, 17–19 y 22–24) fueron uno de los principales tipos de compuestos fenólicos no antocianicos detectados. Todos ellos se caracterizaban por presentar un espectro UV-Vis (Figura IV.6) con un máximo próximo a 360 nm (característico de los flavonoles) y, a excepción del pico 19, compartían además un espectro MS^2 en el que aparecía siempre un fragmento de m/z 301 uma, lo que sugiere que se trata de derivados de quercetina.

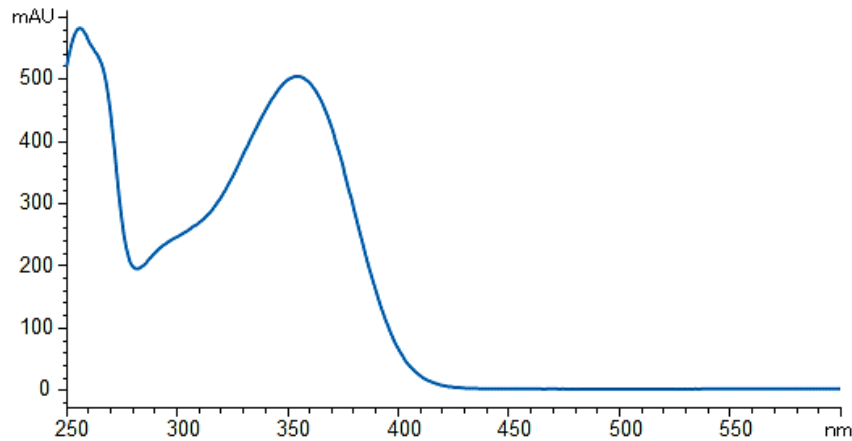


Figura.IV.6 Espectro UV-Vis del pico 13, característico de flavonoles

A partir de los iones pseudomoleculares y las pérdidas de masa observadas: 308 uma (disacárido del tipo hexosa-desoxihexosa, frecuentemente rutinosa), 162 uma (hexosas como glucosa o galactosa), 132 uma (pentosas como xilosa o arabinosa) y 176 uma (glucurónido), se han identificado tentativamente diferentes derivados glicosilados de la quercetina. En el caso del pico 19, la presencia de un fragmento de m/z 285 permite asociarlo a un derivado de kaempferol.

De todos flavonoles detectados destaca como mayoritario el pico 15, identificado como quercetin-glucurónido, que fue el principal flavonol presente en los extractos de mora andina de ambas zonas altitudinales en las tres etapas de madurez (Figura.IV.5). Según los resultados obtenidos, el perfil fitoquímico cualitativo de todos los extractos fue similar, independientemente de ambos factores. En un estudio sobre los perfiles fenólicos de moras maduras (*Rubus sp.*) cultivadas en Boyacá (Colombia) también se encontró la presencia destacada de derivados de quercetina, con quercetin-glucurónido como flavonol predominante en *R. glaucus*, mientras que en *R. alpinus* los compuestos principales fueron quercetin-glucósido y kaempferol-3-glucósido (Moreno-Medina, Casierra-Posada y Medina-Vargas, 2023). En otro estudio, centrado en el análisis de las especies de *Rubus* de Ecuador (*R. glaucus*) y Costa Rica (*R. adenotrichus*), se identificaron quercetin-glucurónido y quercetin-glucósido como los principales compuestos en ambas especies. Estos flavonoides se encontraron en concentraciones similares en las dos especies estudiadas, lo que indica que comparten un perfil fitoquímico

comparable a pesar de su diferente origen geográfico (Mertz et al. 2007). En el presente estudio cabe señalar que si se observa con detenimiento la Figura IV.5 se puede comprobar un pequeño desdoblamiento en la base del pico 15 que se corresponde con quercetin-glucósido, solapamiento similar al señalado por los citados autores. También se identificó quercetin-glucurónido en muestras de *R. ulmifolius* Schott colectadas en Sicilia (Italia), aunque no fue predominante como en otras especies, sino que (epi)catequina, un flavan-3-ol no detectado en este estudio, era el principal constituyente en ese caso (Candela et al. 2021).

Se detectaron, asimismo, diversos derivados de ácidos fenólicos, en particular de ácido ferúlico (pico 6), cafeico (pico 7), siríngico (pico 8) y *p*-hidroxibenzoico (pico 5).

El resto de picos en los cromatogramas de la Figura IV.5 (1-3, 9-12, 14, 16, 20 y 21) tenían en común la presencia de un ion pseudomolecular (pico 14) o un fragmento de m/z 301 uma. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en los derivados de quercetina descritos anteriormente, en los que también se detecta un fragmento similar, en este conjunto de picos el espectro UV-Vis era sensiblemente diferente, con un máximo a 360 nm mucho menos pronunciado que en los casos anteriores (Figura IV.7), lo que permitía identificarlos como elagitaninos, derivados glicosilados del ácido elágico o el propio ácido elágico (pico 14), si bien todos ellos, salvo el pico 10, presentaron áreas bajas. Estos compuestos, especialmente el ácido elágico, son comunes en frutos del género *Rubus* (Bobinait, Viškelis y Venskutonis 2012). En las últimas décadas, el ácido elágico ha ganado atención al haberse descrito su capacidad para regular vías de señalización celular, así como potencial para mitigar, prevenir o ralentizar la progresión de enfermedades crónicas como diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer (Wang et al. 2023).

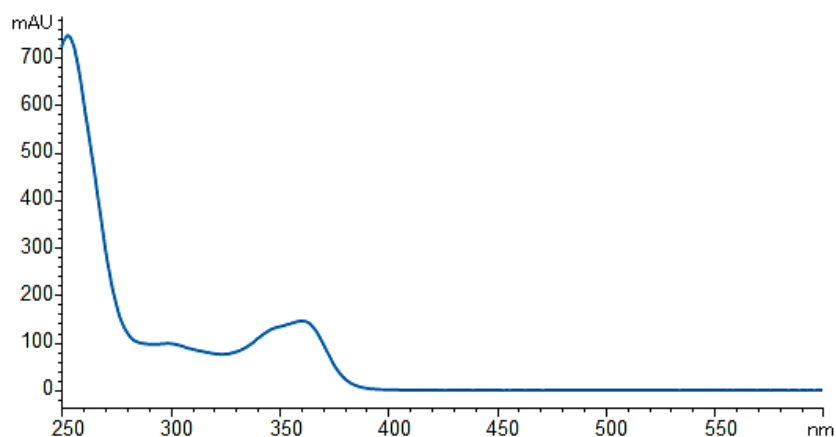


Figura.IV.7. Espectro UV-Vis del pico 11, característico de ácido elágico y derivados

La identificación precisa de los elagitaninos a partir de datos obtenidos por LC-MS es compleja por su elevada masa molecular y la existencia de isómeros con valores de m/z idénticos y patrones de fragmentación similares (Alarcón-Barrera et al. 2018). En concreto en este estudio se ha confirmado la presencia de dos grupos de compuestos con el mismo ion pseudomolecular ($[M-H]^-$ de m/z 935 o 633) y patrones de fragmentación. En concreto, los picos 1 y 2, con un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z de 633 (Tabla IV.4), se pueden asociar a isómeros de galoil-HHDP-glucosa, mientras que los $[M-H]^-$ de m/z de 935 (picos 3, 9 y 10) se pueden asociar a isómeros de galoil-bis-HHDP-glucosa. Entre ellos, el pico 10 fue el principal elagitanino detectado en las muestras analizadas (Figura.IV.5). Un elagitanino con la misma masa fue detectado por Stintzing et al. (2002) en muestras de *Rubus laciniatus* de Oregón (EE.UU.), aunque se trataba de un compuesto menor. Por su parte, en muestras de *R. adenotrichus* de Costa Rica, el principal compuesto de esta familia identificado fue lambertianina C, un elagitanino de elevada masa molecular (2806 g/mol) (Mertz et al. 2007). Aunque no se ha podido establecer la identidad concreta de cada uno de los isómeros correspondientes a los picos 3, 9 y 10, elagitaninos como casuarictina, casuarinina o potentilina descritos en otras bayas del género *Rubus* (Mertz et al. 2007).

Aunque los elagitaninos son menos abundantes en la dieta que otros polifenoles, se encuentran en cantidades significativas en bayas del género

Rubus, como moras y frambuesas (Arozarena et al. 2012; Sangiovanni et al. 2013). Se trata de compuestos a los que se atribuyen una diversidad de efectos beneficiosos, como antitumorales, antidiabéticos, antimutagénicos, antibacterianos, antiproliferativos y antimicóticos (Pinheiro et al. 2019), además de contribuir a extender la vida útil de los frutos gracias a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Enomoto, 2021).

En la Figura IV.8. se representa el cromatograma registrado a 520 nm, con el perfil de antocianos, y en la Tabla IV.5 se recoge su identificación tentativa. En este caso, los glicósidos de cianidina fueron los compuestos predominantes, destacando cianidina 3-*O*-rutinósido (pico A3), con solo dos picos menores correspondientes a derivados de pelargonidina (picos A4 y A5). Diversos estudios han identificado y cuantificado antocianos en moras andinas, confirmando los resultados del presente estudio (Horvitz, Chanaguano y Arozarena 2017; Mertz et al. 2007; Ortiz 2010). Tulio et al. (2008) encontraron que cianidina 3-*O*-rutinósido constituía la principal antocianina en *Rubus glaucus* y *R. occidentalis*, representando en promedio el 46 % y 39 % del total de antocianos, respectivamente; además, identificaron cantidades menores de cianidina 3-*O*-glucósido (5–6 %) e insignificantes de pelargonidina 3-*O*-rutinósido. En otras especies como *Rubus adenotrichus* (Costa Rica) (Mertz et al. 2007), *R. ulmifolius* Schott (Brasil) (Schulz et al. 2019), *R. alpinus* (Colombia) (Moreno-Medina, Casierra-Posada y Medina-Vargas 2023), *R. croceacanthus*, *R. idaeus* y *R. sieboldii* (Japón) (Kubota et al. 2012) y *R. laciniatus* Willd (EE.UU.) (Stintzing et al. 2002) los principales antocianos identificados fueron cianidina 3-*O*-glucósido y pelargonidina 3-*O*-rutinósido. Estas variaciones pueden deberse no sólo a determinantes genéticos, sino también a factores agronómicos y geográficos (Cho et al. 2005).

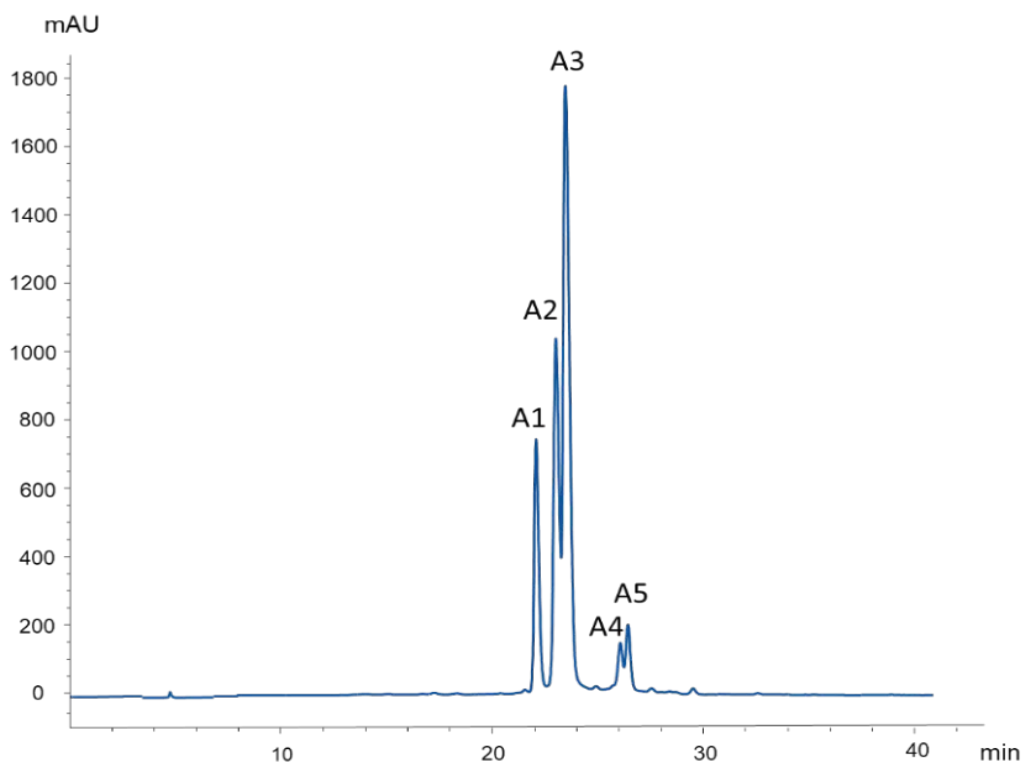


Figura.IV.8. Cromatograma de HPLC-DAD registrado a 520 nm de un extracto de mora completamente madura (*Rubus glaucus* Benth). Las identidades de los picos A1-A5 se describen en la tabla IV.5.

Tabla.IV.5. Identificación tentativa de los antocianos detectados en *Rubus glaucus* Benth mediante HPLC-DAD/ESI-MS.

Pico	RT (min)	Ion molecular [M] ⁺ (m/z)	Principales fragmentos MS ² (m/z)	Identificación tentativa
A1	22,1	727	287	Cianidina-3- <i>O</i> -pentosil-rutinósido
A2	23,2	449	287	Cianidina 3- <i>O</i> -glucósido
A3	23,5	595	449, 287	Cianidina 3- <i>O</i> -rutinósido
A4	26,0	433	271	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucósido
A5	26,5	579	433, 271	Pelargonidina-3- <i>O</i> -rutinósido

- Determinación de polifenoles (TPC), flavonoides (TFC) y antocianos totales (ACY)

Los resultados obtenidos en los análisis de TPC, TFC y ACY permitieron establecer que, al igual que en el mortiño, la altitud es un factor determinante en los contenidos de compuestos fenólicos en la mora, encontrándose los niveles más altos en los extractos de las muestras recolectadas a mayor altitud en cada etapa de madurez. (Tabla IV.6; Figura IV.9). En los casos de los polifenoles y de

los flavonoides totales las mayores concentraciones se determinaron a 3200 (m.s.n.m.) en la etapa de madurez 3, cuando los frutos estaban inmaduros y su pigmentación era verde/rojiza. Por el contrario, el menor contenido se registró a 2360 (m.s.n.m), cuando el fruto estaba completamente maduro (etapa de madurez 1). Resultados similares han sido reportados en otros estudios. Así, por ejemplo, una investigación previa determinó el contenido de polifenoles totales en diez cultivares de mora bajo condiciones tropicales, encontrando que la concentración de estos compuestos fue mayor a altitudes elevadas en comparación con cultivares cultivados a menor altitud (Guedes et al. 2017). Estudios en *Rubus fruticosus* (Gramza-Michałowska, Sidor y Kulczyński 2017) y *R. idaeus* (Anttonen y Karjalainen 2005; Dvaranauskaite, Venskutonis y Labokas 2006) determinaron concentraciones más altas de ácido elágico en relación con otros componentes fenólicos a medida que aumenta la altitud. La combinación de condiciones ambientales extremas, con temperaturas más bajas y alta radiación UV existentes a mayor altura influye positivamente en el contenido total de polifenoles (de Oliveira et al. 2019).

Por otra parte, los resultados mostraron una disminución significativa en los polifenoles y los flavonoides totales desde el estado inmaduro hasta el estado completamente maduro independientemente de la altitud (Tabla IV.6, Figuras IV.9A y IV.9B). Durante el desarrollo y la maduración de las frutas, ocurren cambios sustanciales en las contribuciones relativas de las diferentes clases de compuestos (Beekwilder et al. 2005; Gramza-Michałowska et al. 2019). Por ejemplo, está bien establecido que mientras la mayoría de los compuestos fenólicos disminuyen a medida que la fruta madura, los antocianos aumentan significativamente. Igualmente, la proporción y contenido de compuestos individuales dentro de cada familia fenólica pueden variar en función de factores ambientales, como se ha comprobado en estudios realizados en distintas especies de *Rubus*, como mora (*Rubus* sp), frambuesa negra (*R. occidentalis* L) o frambuesa roja (*R. idaeus* L) de distintas localizaciones (Dvaranauskaite, Venskutonis y Labokas 2006; Makris y Rossiter, 2001; Wang, Shioh y Lin Hsin-Shan, 2000). Todas estas observaciones coinciden con las anteriormente

realizadas y discutidas para las muestras de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Tabla.IV.6. Contenidos de polifenoles, flavonoides y antocianos totales en la mora andina (*Rubus glaucus* Benth) según la altitud del sitio de recolección y la etapa de madurez del fruto.

Parámetros	Altitud	Estado de madurez			<i>p</i> -valor (Estado)
		Estado 1 [◇]	Estado 2 [◇]	Estado 3 [◇]	
TPC (mg GAE/100 g PS) ¹	3200 (m.s.n.m)	18,1 ± 0,7	23,1 ± 0,1	30,9 ± 0,48	< 0,001
	2360 (m.s.n.m)	15,6 ± 0,5	16,9 ± 0,1	26,2 ± 1,81	< 0,001
<i>p</i>-valor (Altitud)		0,028	< 0,001	0,012	
TFC (mg Cateq/g PS) ¹	3200 (m.s.n.m)	4,6 ± 0,2	6,3 ± 1,5	7,2 ± 0,3	< 0,001
	2360 (m.s.n.m)	4,1 ± 0,2	5,1 ± 1,2	6,4 ± 0,1	< 0,001
<i>p</i>-valor Altitud)		0,05	0,006	0,05	
ACY (mg Cy Eq/g PS) ¹	3200 (m.s.n.m)	5,3 ± 0,1	1,22 ± 0,1	0,2 ± 0,01	< 0,001
	2360 (m.s.n.m)	3,9 ± 0,1	0,8 ± 0,04	0,1 ± 0,01	< 0,001
<i>p</i>-valor (Altitud)		< 0,001	0,05	0,06	

¹ Los resultados se expresan como media ± DE.

[◇] (Etapa 1: completamente maduro; etapa 2: 75 % pigmentado, y etapa 3: menos del 50 % pigmentado). TPC: Contenido de polifenoles totales; TFC: Contenido de flavonoides totales; ACY: Contenido de antocianos totales.

A diferencia de los contenidos de polifenoles y de flavonoides totales, se observó un aumento significativo en los de antocianos totales a medida que progresaba la madurez de las moras, encontrando diferencias significativas en todos los casos (Tabla IV.6; Figura IV.9C). Esta acumulación de antocianos se ve reflejada en el cambio de color observado (Figura III.2).

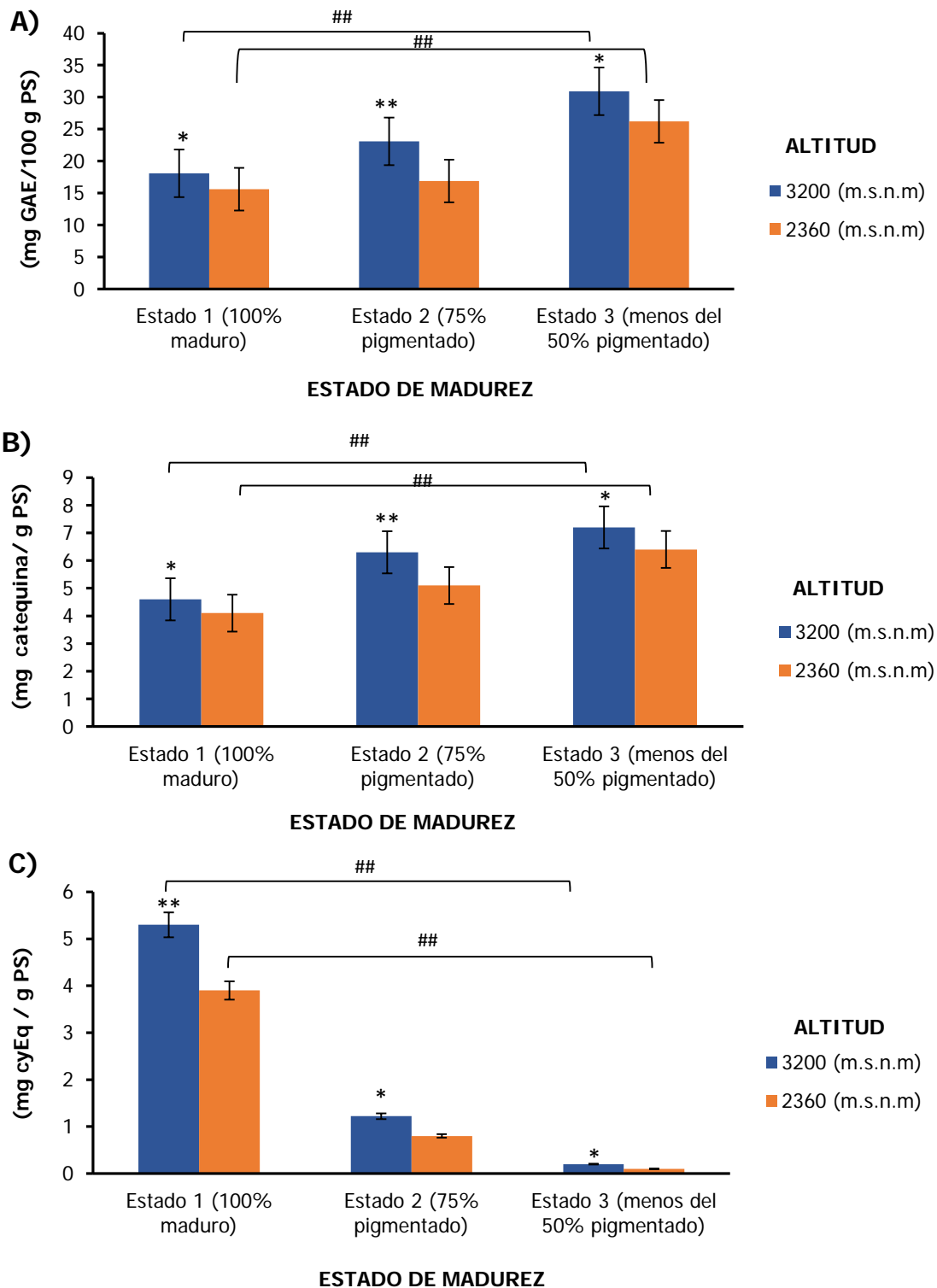


Figura.IV.9. Comparaciones múltiples de la composición fenólica de la mora (*Rubus glaucus* Benth) con respecto a tres etapas de madurez basadas en su pigmentación (Estado 1: completamente maduros, estado 2: 75 % completamente pigmentados y estado 3: menos del 50 % pigmentados) en muestras recolectadas a alta (3641 m.s.n.m.) y baja (2836 m.s.n.m.) altitud. (A) Polifenoles totales, (B) contenido total de flavonoides y (C) contenido total de antocianos. Los resultados se expresan como media \pm DE de tres experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, diferencias significativas en comparación con la altitud baja; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, diferencias significativas entre los grupos de etapas de madurez a baja y alta altitud.

En un estudio realizado en Bulgaria se analizaron frutos completamente maduros de frambuesa (*Rubus idaeus L*) recolectados a altitudes entre 171 y 1804 (m.s.n.m.), reportándose concentraciones de antocianinas hasta cuatro veces superiores en las zonas de mayor altitud (Papanov et al. 2019), donde se alcanzaban concentraciones promedio de 3,9 mg Cy Eq/g. En el presente trabajo, utilizando el mismo protocolo basado en el método del pH diferencial, se determinaron concentraciones medias de antocianinas de 4,6 mg Cy Eq/g en moras completamente maduras cultivadas a altitudes aún mayores, lo cual podría corroborar la influencia de la altitud en la biosíntesis de estos compuestos. No obstante, la acumulación de antocianinas podría estar también modulada por factores adicionales, como las características genéticas de la especie o cultivar, limitaciones fisiológicas en su capacidad de acumulación o la influencia de otras condiciones ambientales aún no caracterizadas (Anttonen y Karjalainen 2005). Además, posibles variaciones metodológicas, como diferencias en el manejo de las muestras, las condiciones experimentales o la calibración de los equipos, podrían haber influido en los resultados, por lo que deben considerarse al interpretar y comparar los datos.

Por otro lado, no solo la concentración sino también el perfil antociánico cambia a medida que maduran las bayas. Así, los derivados de pelargonidina (pelargonidina-3-glucósido y 3-rutinósido) solo se detectan en los extractos de las muestras completamente maduras (etapa 1, Figura IV.10). Esto coincide con lo descrito por otros autores, que también reportan la presencia de derivados de cianidina y pelargonidina como principales antocianos en bayas de mora andina completamente maduras, mientras que en frutos inmaduros o casi maduros no detectan pelargonidina (Moreno-Medina, Casierra-Posada y Medina-Vargas 2023; Ortiz 2010). Igualmente, en estudios realizados en frambuesa (*R. idaeus*), Beekwilder et al. (2005) encontraron que antocianos como cianidina-3-glucósido ya están presentes en bayas inmaduras (verdes), mientras que otros glicósidos de cianidina y pelargonidina aparecen solo cuando se desarrolla el color rojo en la fruta.

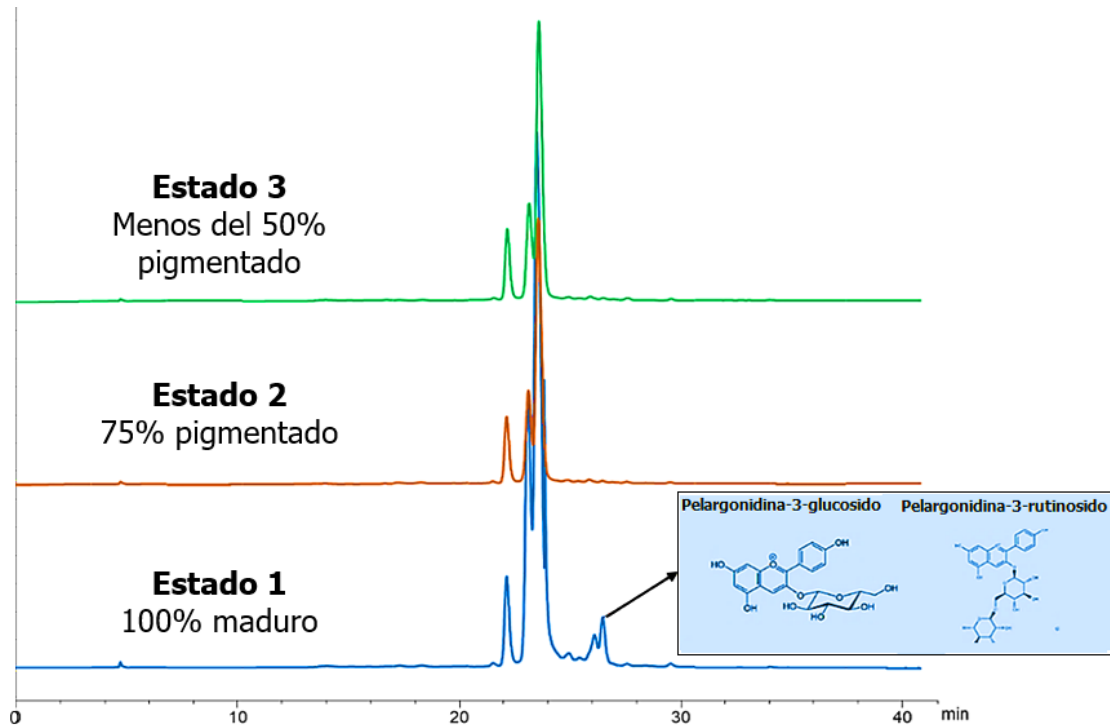


Figura.IV.10. Cromatogramas HPLC-DAD registrados a 520 nm para moras andinas. Comparaciones entre tres etapas de madurez a altitudes muy altas (verde: 50 % de madurez, naranja: 75 % de madurez y azul: 100 % de madurez)

4.2.2 Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos fenólicos de la mora

La Tabla IV.7 muestra los resultados obtenidos en los análisis de la capacidad antioxidante total (TAC) de los extractos de las moras andinas, determinados mediante el ensayo de captura del radical $ABTS^{\bullet+}$ y el método de poder reductor férrico (FRAP).

Se puede observar que durante la maduración del fruto la capacidad antioxidante disminuyó en ambas altitudes (Figura IV.11). Los valores más altos de TAC se encontraron en las muestras recolectadas a mayor altitud en la etapa de madurez 3 (fruto inmaduro), mientras que los valores más bajos se observaron en las moras completamente maduras a menor altitud en ambos casos, con diferencias significativas entre las etapas de madurez en las altitudes alta y baja al comparar todos los grupos entre sí (Tabla IV.7). Los resultados son coherentes con los obtenidos para los contenidos de polifenoles (TPC) y de flavonoides totales (TFC) (Tabla IV.6), sugiriendo que existe una relación positiva entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Tabla.IV.7. Capacidad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de mora andina (*Rubus glaucus* Benth) recolectada a diferentes altitud y estado de madurez.

Parámetros	Altitud	Estado de madurez			<i>p</i> -valor (Estado)
		Estado 1 [◇]	Estado 2 [◇]	Estado 3 [◇]	
FRAP ($\mu\text{mol TEq/g PS}$) ¹	3200 (m.s.n.m)	127,2 \pm 1.1	220,1 \pm 1,7	318,4 \pm 4,3	< 0,001
	2360 (m.s.n.m)	110,0 \pm 3.3	196,5 \pm 2,6	260,8 \pm 4,4	< 0,001
<i>p</i>-valor (Altitud)		0,001	< 0.001	< 0.001	
ABTS ($\mu\text{mol TEq/g PS}$) ¹	3200 (m.s.n.m)	414,4 \pm 5,7	527,1 \pm 3,3	628,9 \pm 5,1	< 0,001
	2360 (m.s.n.m)	305,1 \pm 10,0	436,1 \pm 12,6	537,5 \pm 5,1	< 0,001
<i>p</i>-valor Altitud)		< 0,001	< 0,001	< 0,001	

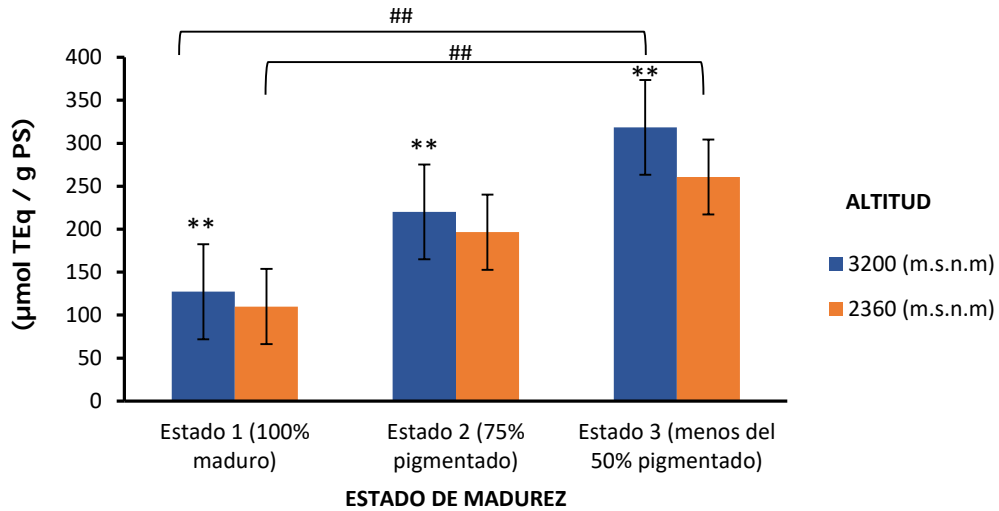
¹ Resultados expresados en μmol de equivalentes Trolox por g de extracto seco de muestra como media \pm DE. FRAP: Ensayo de poder reductor/antioxidante férrico, DPPH: Método de 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazilo.

[◇](Estado 1: fruto completamente maduro; estado 2: 75 % pigmentado, y estado 3: menos del 50 % pigmentado).

La existencia de una relación entre capacidad antioxidante y la concentración y composición de compuestos fenólicos, ha sido observada por diversos autores. Dvaranauskaite, Venskutonis y Labokas (2006) encontraron una relación lineal entre capacidad antioxidante y contenidos de antocianinas y de polifenoles totales en frambuesas maduras (*R. idaeus* L.). En estudios realizados en fresas y frambuesas se estableció que tanto las concentraciones de polifenoles como la capacidad antioxidante venían determinadas por lugar de producción y las condiciones climáticas, aumentando con la altitud y la temperatura (Kim y Shin 2015; Milošević et al. 2012; Papanov et al. 2019; Ponder y Hallmann 2019). Antocianos, elagitaninos y proantocianidinas se han indicado como los compuestos con mayor influencia sobre la actividad antioxidante de las bayas (Beekwilder et al. 2005), aunque otros polifenoles, como ácido elágico y los flavonoles (kaempferol y quercetina), presentes en menores concentraciones, también influirían sobre la actividad antioxidante y jugarían un papel importante en los efectos protectores asociados a estos frutos (Chung et al. 2022). La contribución relativa de las diferentes clases de compuestos fenólicos durante el desarrollo y la maduración de las bayas influye, por tanto, de manera determinante sobre su potencial antioxidante, aunque es difícil establecer en qué

medida. De acuerdo con Beekwilder et al. (2005), aunque elagitaninos y proantocianidinas, a diferencia de los antocianos, disminuyen considerablemente durante la maduración de las bayas, aún contribuirían entre un 30 % y 60 % a la actividad antioxidante total de la frambuesa.

A) Ensayo FRAP



B) Ensayo ABTS^{•+}

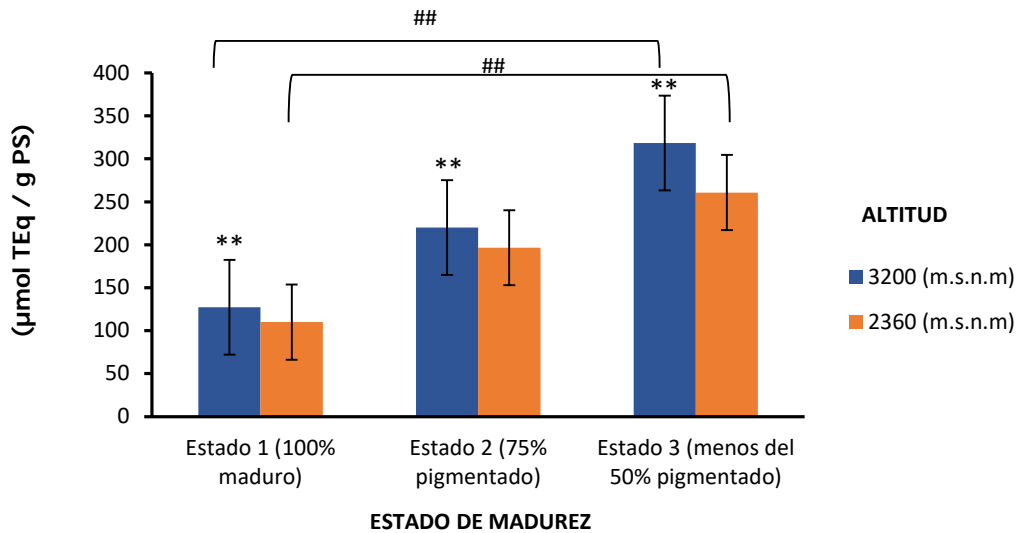


Figura.IV.11. Comparaciones múltiples entre la capacidad antioxidante de la mora (*Rubus glaucus* Benth) en tres etapas de madurez basadas en su pigmentación (Estado 1: completamente maduros, estado 2: 75 % completamente pigmentados y estado 3: menos del 50 % pigmentados) en muestras recolectadas a alta (3641 m.s.n.m.) y baja (2836 m.s.n.m.) altitud. (A) Ensayo FRAP, y (B) ensayo ABTS^{•+}. Los resultados se expresan en μmol de equivalentes Trolox por g de extracto seco de muestra como media ± DE de tres experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, diferencias significativas en comparación con la altitud baja; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, diferencias significativas entre los grupos de etapas de madurez a baja y alta altitud.

4.3. Estudios en *Caenorhabditis elegans*

4.3.1 Efectos de los extractos fenólicos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y de mora (*Rubus glaucus* Benth) en la resistencia al estrés oxidativo inducido térmicamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los análisis de la composición fenólica y capacidad antioxidante de los extractos de mortiño y de mora, se eligieron los correspondientes a dos estados de madurez: maduro e inmaduro (menos de 50 % de pigmentación), de las muestras recolectadas a gran altitud para evaluar los efectos sobre resistencia a estrés y longevidad utilizando la cepa silvestre N2 de *C. elegans*. Las concentraciones de extracto utilizadas en los distintos ensayos (entre 30 y 500 µg/mL, según los casos) se seleccionaron en función de aquellas que habían mostrado efectos protectores frente a estrés térmico en *C. elegans* en ensayos previos de exploración.

En la Figura IV.12 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de resistencia a estrés oxidativo inducido térmicamente (35 °C, 8 h), aplicado en los días 2 y 9 de vida, en nematodos cultivados en presencia de 100 y 300 µg/mL de extracto de mortiño inmaduro frente a gusanos sin tratamiento (control). Se puede comprobar un aumento significativo en las tasas de supervivencia en los gusanos tratados con extractos de mortiño con relación a sus respectivos controles no tratados en ambos días de vida. A día 2 de adultos, en el grupo control se observó una supervivencia del 55 % tras aplicación del estrés, mientras que los tratados mostraron aumentos en la supervivencia que alcanzaban el 76-77 %, similares para ambas concentraciones de extracto. Cuando el estrés se aplicó en el día 9 de la etapa adulta, las tasas de supervivencia aumentaron del 43 % en el grupo control al 68-69 % en gusanos tratados, nuevamente similares para ambas concentraciones.

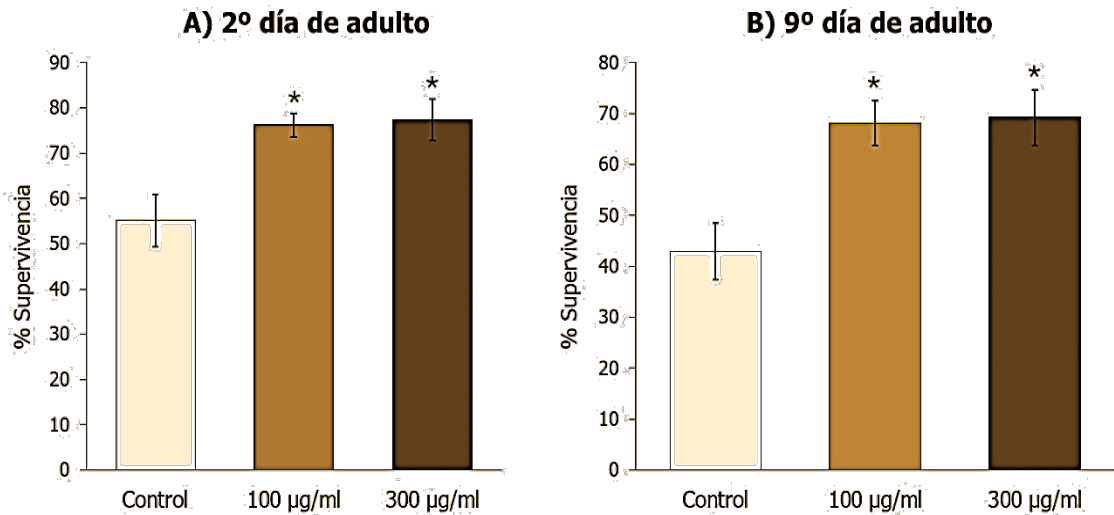


Figura IV.12. Porcentajes de supervivencia de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* tras aplicación de un estrés térmico (35 °C, 8 h) en los días 2 (A) y 9 (B) de adulto en gusanos cultivados en presencia de extracto de mortiño inmaduro a dos concentraciones (100 y 300 µg/mL) frente a gusanos no tratados (control). Los resultados representan la media \pm DE de tres ensayos independientes, realizado cada uno con una población de 100 gusanos por tratamiento. Las diferencias se refieren a las existentes entre las poblaciones tratadas y el ensayo control. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado ($*p < 0,05$).

La Figura IV.13 muestra los resultados obtenidos en los gusanos tratados con extracto de mortiño maduro. Se observó que en este caso se producía un aumento significativo en la tasa de supervivencia en los ensayos realizados en adultos jóvenes (día 2), desde el 49 % en el grupo control al 79 % y 69 %, para los tratamientos realizados a concentraciones de 100 y 300 µg/mL, respectivamente. Sin embargo, cuando el estrés era aplicado en el día 9 de la etapa adulta, aunque también se encontró un aumento en la supervivencia desde el 42 % (control) al 54-51 %, éste no fue estadísticamente significativo.

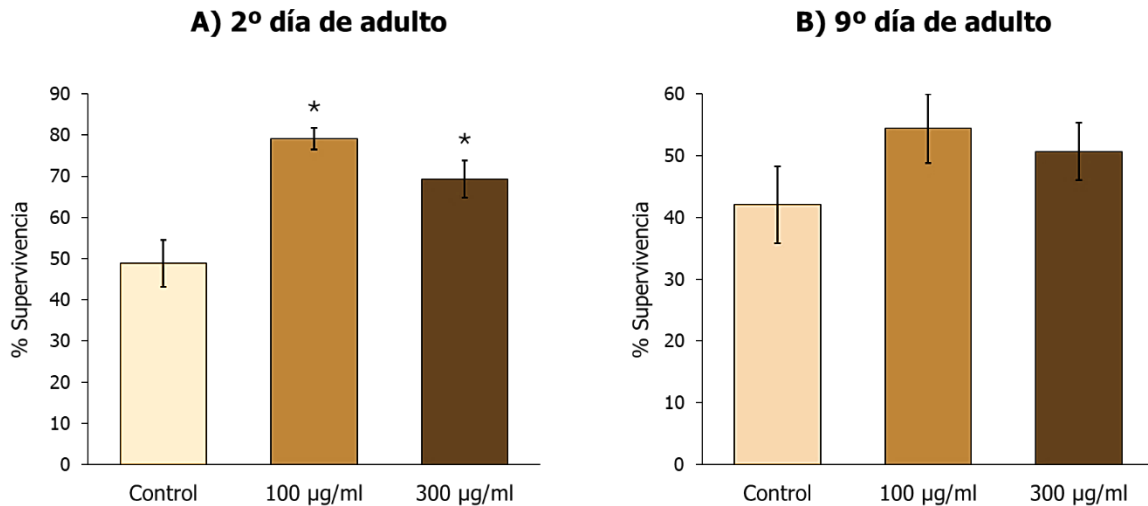


Figura IV.13. Porcentajes de supervivencia de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* tras aplicación de un estrés térmico (35 °C, 8 h) en los días 2 y 9 de adulto en gusanos cultivados en presencia de extracto de mortiño maduro a dos concentraciones (100 y 300 µg/mL) frente a gusanos no tratados (control). Los resultados representan la media ± DE de tres ensayos independientes, realizado cada uno con una población de 100 gusanos por tratamiento. Las diferencias se refieren a las existentes entre las poblaciones tratadas y el ensayo control. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0,05$).

De modo similar a los casos anteriores, en las Figuras IV.14 y IV.15 se recogen los resultados obtenidos en los ensayos correspondientes a los tratamientos realizados con extractos de mora en sus estados inmaduro y maduro respectivamente, en respuesta al estrés térmico. En los gusanos adultos jóvenes, la supervivencia aumentó desde el 66 % en el grupo control al 72 % y 81 % en los tratados con mora inmadura a concentraciones de 30 y 100 µg/mL, respectivamente, pero no en los cultivados en presencia de 300 µg/mL de extracto, en los que, por el contrario, se observó una disminución en la supervivencia, aunque no significativa, respecto al control. Resultados similares fueron obtenidos en los ensayos realizados en el día 9 de la etapa adulta, con aumentos en la tasa de supervivencia desde el 66 % (control) al 70 % y 79 % en los tratados con mora inmadura a concentraciones de 30 y 100 µg/mL, respectivamente, y disminución en el tratamiento con 300 µg/mL de extracto. Solo se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando los nematodos fueron tratados con mora inmadura a 100 µg/mL en los días 2 y 9 de adulto (Figura IV.14).

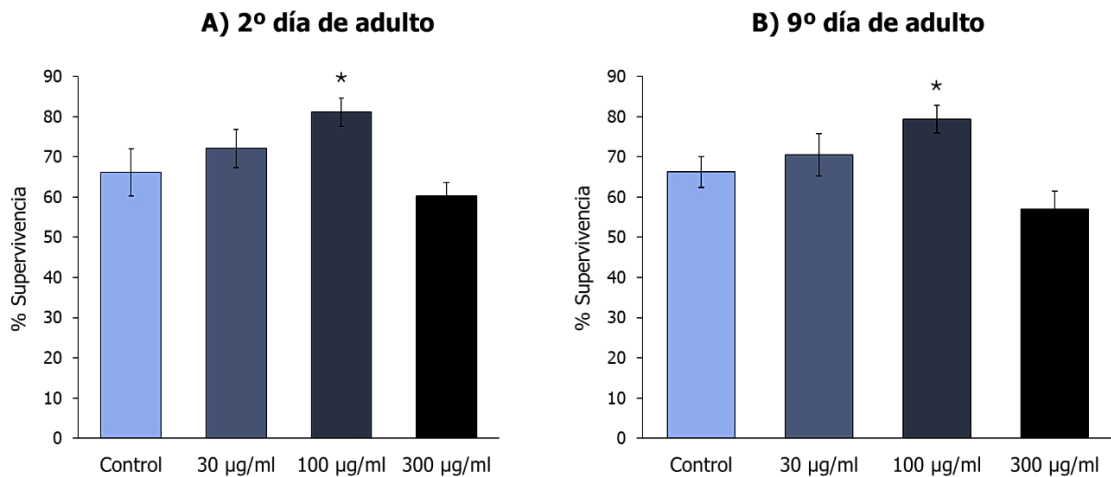


Figura IV.14. Porcentajes de supervivencia de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* tras aplicación de un estrés térmico (35 °C, 8 h) en los días 2 y 9 de adulto en gusanos cultivados en presencia de extracto de mora inmadura a tres concentraciones frente a gusanos no tratados (control). Los resultados representan la media \pm DE de tres ensayos independientes, realizado cada uno con una población de 100 gusanos por tratamiento. Las diferencias se refieren a las existentes entre las poblaciones tratadas y el ensayo control. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0,05$).

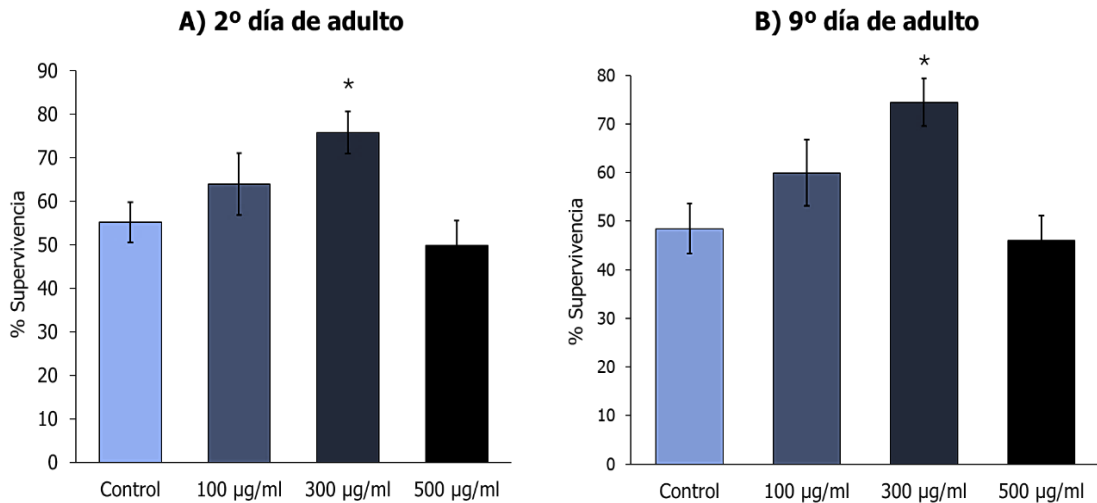


Figura IV.15. Porcentajes de supervivencia de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* tras aplicación de un estrés térmico (35 °C, 8 h) en los días 2 y 9 de adulto en gusanos cultivados en presencia de extracto de mora madura a tres concentraciones frente a gusanos no tratados (control). Los resultados representan la media \pm DE de tres ensayos independientes, realizado cada uno con una población de 100 gusanos por tratamiento. Las diferencias se refieren a las existentes entre las poblaciones tratadas y el ensayo control. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0,05$).

En los ensayos realizados con mora madura se encontraron aumentos en las tasas de supervivencia tanto en adultos jóvenes tratados con concentraciones de 100 y 300 µg/mL de extracto (del 55 % en el control al 64 % y 76 %, respectivamente) como en adultos de más edad (del 48 % en el control al 60 % y 74 %, respectivamente). Sin embargo, en los gusanos tratados con una concentración más elevada de extracto de mora madura (500 µg/mL), la supervivencia disminuyó, aunque de forma no significativa, tanto en el día 2 como en el día 9 de la etapa adulta, en comparación con el grupo control. Cabe destacar que las diferencias significativas en la supervivencia se observaron únicamente en los gusanos tratados con 100 µg/mL de extracto en los días 2 y 9 de la etapa adulta (Figura IV.15).

Un hallazgo interesante es la existencia de un mayor aumento en las tasas de supervivencia en gusanos adultos jóvenes (día 2) que en los de edad más avanzada (día 9). Una observación similar fue también realizada en estudios anteriores de nuestro grupo con el flavonol quercetina (Ayuda-Durán et al., 2019b) y podría sugerir que el tratamiento con polifenoles no solo mitigaría el daño inmediato, sino que también podría contribuir a reprogramar la maquinaria celular, especialmente en organismos jóvenes, cuya plasticidad celular permitiría una mayor capacidad de respuesta a las intervenciones antioxidantes.

Los resultados obtenidos revelan, por otra parte, que los efectos protectores frente al estrés del tratamiento tanto de mora como de mortiño se observan solo a determinadas concentraciones de los extractos fenólicos ensayados. Sin embargo, a niveles de concentración más elevados la capacidad protectora disminuye e incluso conduce a una menor tasa de supervivencia que en los controles no tratados. Esta observación es relevante y coherente con resultados obtenidos por el grupo de investigación con distintos compuestos y extractos fenólicos (Ayuda-Durán et al. 2019a; Ayuda-Durán et al. 2022; Dueñas et al. 2013; Jara-Palacios et al. 2013) que apuntan a la existencia de un comportamiento de tipo hormético en respuesta a la concentración de polifenoles, en el sentido de que dosis relativas bajas darían lugar a efectos beneficiosos, mientras que más elevadas serían perjudiciales. En estudios

realizados con extractos de arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) ricos en antocianinas en cepas silvestres y mutantes de *C. elegans*, González-Paramás et al. (2020) encontraron que el tratamiento con una concentración de 5 µg/mL de extracto reducía la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y aumentaba la resistencia al estrés en todos los casos, mientras que el tratamiento con 10 µg/mL mostraba efectos adversos. Otro estudio del grupo de investigación, realizado con extractos de orujo de uva Zalema ricos en flavanoles y flavonoles, arrojó resultados similares, revelando que la resistencia de *C. elegans* al estrés aumentaba cuando los nematodos se cultivaban con concentraciones bajas de extracto (100 µg/mL), mientras que concentraciones más altas (300 µg/mL) reducían la supervivencia (Jara-Palacios et al. 2013). En este contexto, se ha propuesto que los polifenoles en concentraciones relativas bajas más que como antioxidantes podrían funcionar dentro de un sistema biológico como agentes estresantes leves, ya que pueden metabolizarse a quinonas con características pro-oxidantes, lo que provocaría un nivel moderado de estrés oxidativo que activaría las defensas antioxidantes endógenas y, en consecuencia, mejoraría la citoprotección total (Halliwell 2008; Tang y Halliwell 2010). De este modo, niveles controlados de pro-oxidantes, como los que se alcanzarían a partir de la oxidación y metabolismo de los compuestos fenólicos a través de ingestas dietéticas normales, podrían ser beneficiosos para el organismo. Por el contrario, la exposición a concentraciones elevadas de polifenoles, como las que se podrían aportar con suplementos dietéticos con altos contenidos de polifenoles, podría resultar dañina al sobrepasar la capacidad antioxidante del sistema (Halliwell 2008). En todo caso, para una evaluación adecuada de los efectos de los polifenoles, es crucial considerar no solo su concentración total, sino también la naturaleza de los compuestos presentes en cada caso.

4.3.2. Efectos de los extractos fenólicos de mortiño y de mora sobre la duración de vida en *Caenorhabditis elegans*

Se realizaron también ensayos para evaluar la influencia de los extractos fenólicos de mortiño y de mora sobre la longevidad en la cepa silvestre N2 de *C. elegans*. Las concentraciones utilizadas (100 µg/mL para mortiño maduro e inmaduro y mora inmadura, y 300 µg/mL para mora madura) fueron seleccionadas en base a los resultados de los ensayos de resistencia al estrés térmico (apartado 4.3.1), donde se identificaron como las más efectivas. Esta selección estratégica permitió evaluar el impacto de los extractos en la longevidad bajo condiciones óptimas para maximizar sus efectos antioxidantes y protectores en la defensa celular. Las Figuras IV.16 y IV.17 y las Tablas IV.8 y IV.9 recogen los resultados obtenidos en los ensayos de longevidad en los estudios relativos a los extractos de mortiño maduro e inmaduro, respectivamente, y las Figuras IV.18 y IV.19 y las Tablas IV.10 y IV.11 los correspondientes a los extractos de mora.

El tratamiento con extracto de mortiño maduro produjo un aumento significativo ($p < 0,001$) en la vida media de los gusanos ($10,22 \pm 0,35$ días) en comparación con el grupo control ($8,63 \pm 0,43$ días). Además, se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) en la vida máxima, alcanzando $22,63 \pm 0,72$ días frente a $18,56 \pm 1,89$ días en el grupo control (Tabla IV.8).

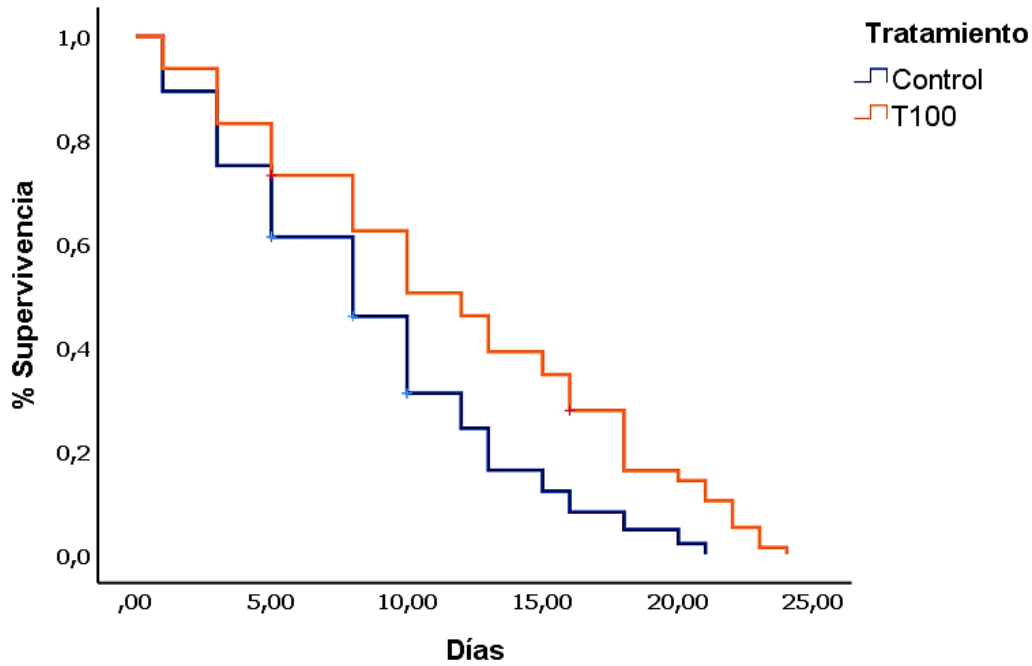


Figura IV.16. Curvas de supervivencia de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) del extracto de mortiño maduro (100 µg/mL) a 20 °C.

Tabla IV.8. Duración de vida de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) de extracto de mortiño maduro (100 µg/mL) en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Resultados expresados como media ± DE (n=3).

Tratamiento	Vida media (días)	p vs Control (log rank)	Vida máxima 10 % (días)*	p vs Control Anova
Control	8,63 ± 0,43		18,56 ± 1,89	
Extracto de mortiño maduro (100 µg/mL)	10,22 ± 0,35	< 0,001	22,63 ± 0,72	< 0,001

*Vida máxima calculada como la duración de vida del 10 % de la población más longeva.

De manera similar, el tratamiento con extracto de mortiño al 50 % de madurez mostró efectos significativos en la longevidad de los gusanos. Los resultados indicaron un incremento notable tanto en la vida media (10,02 ± 0,34 días frente a 8,55 ± 0,42 días en el grupo control, $p < 0,001$) como en la vida máxima de los gusanos tratados (23 ± 1,63 días por 18,38 ± 1,78 días en el control, $p < 0,001$) (Tabla IV.9).

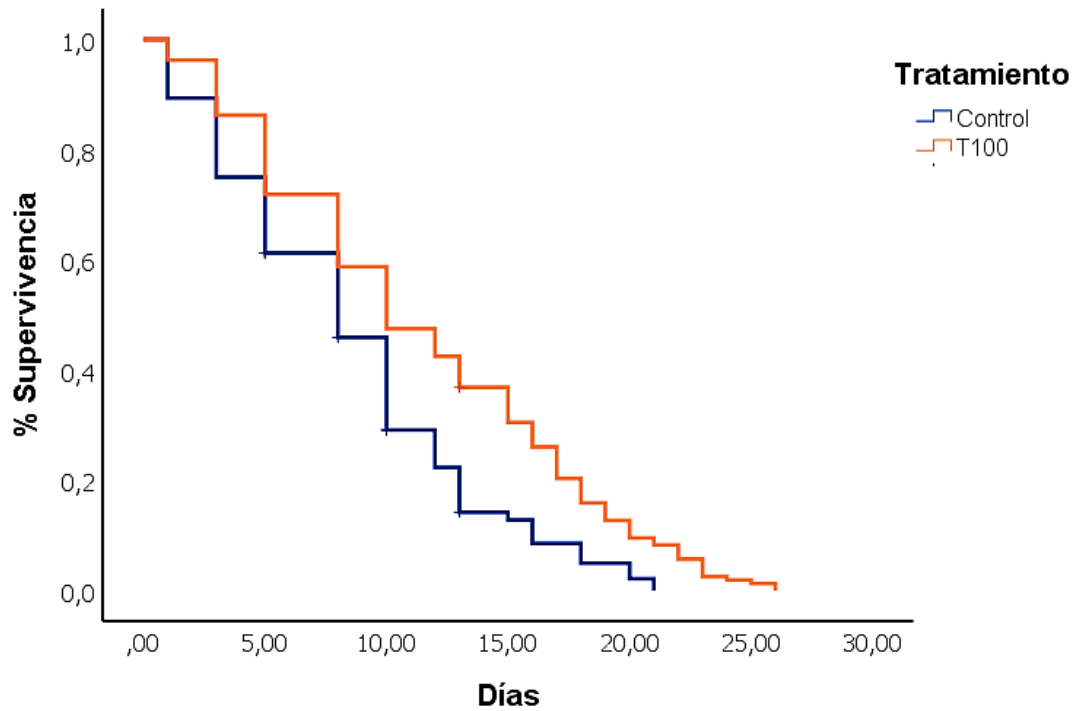


Figura IV.17. Curvas de supervivencia de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) del extracto de mortiño inmaduro (100 µg/mL) a 20 °C.

Tabla IV.9. Duración de vida de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) de extracto de mortiño inmaduro (100 µg/mL) en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Resultados expresados como media ± DE (n=3).

Tratamiento	Vida media (días)	<i>p</i> vs Control (log rank)	Vida máxima 10 % (días)*	<i>p</i> vs Control Anova
Control	8,55 ± 0,42		18,38 ± 1,78	
Extracto de mortiño inmaduro (100 µg/mL)	10,02 ± 0,34	< 0,001	23 ± 1,63	< 0,001

*Vida máxima calculada como la duración de vida del 10 % de la población más longeva.

El tratamiento con extracto de mora madura (300 µg/mL) produjo un aumento significativo en la vida media (14,79 ± 0,42 días frente a 10,51 ± 0,39 días en el control, $p < 0,001$) y máxima de los gusanos (23,58 ± 1,67 días frente a 21,21 ± 1,53 días en el grupo control, $p < 0,001$). El extracto de mora al 50 % de madurez (100 µg/mL) también mostró efectos significativos tanto en la vida media (13,90 ± 0,47 días frente a 10,24 ± 0,42 días en el control, $p < 0,001$)

como en la vida máxima de los gusanos ($24,46 \pm 1,19$ días frente a $21,62 \pm 0,90$ días en el control, $p < 0,001$), valores similares a los observados con el extracto de mora madura, aunque las concentraciones de tratamiento empleadas eran diferentes.

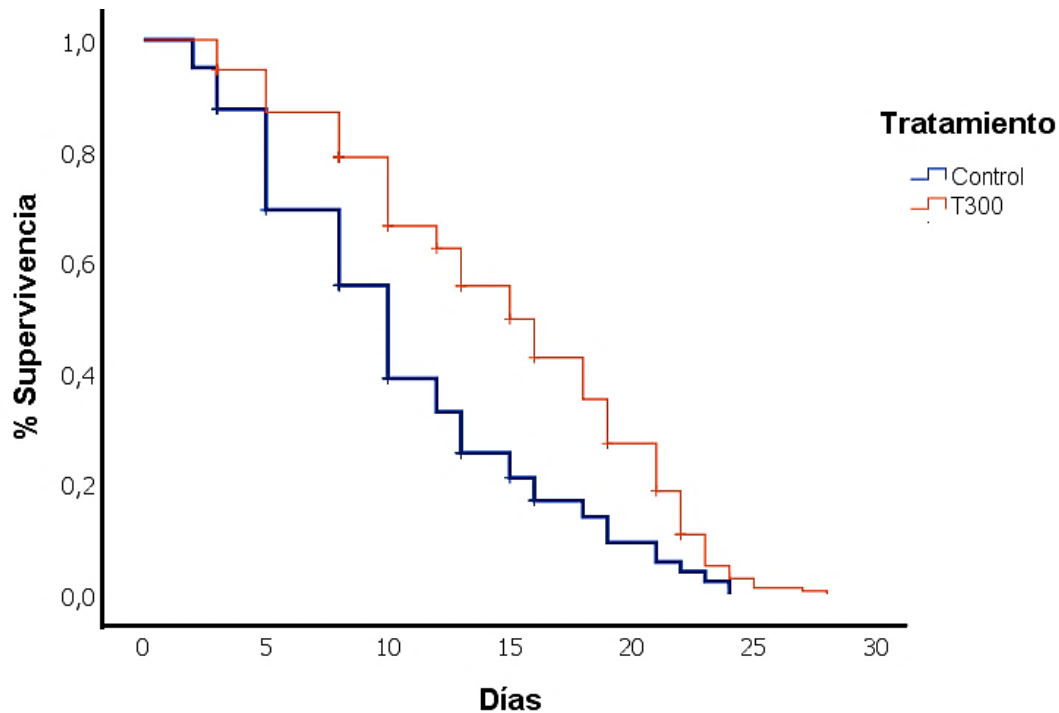


Figura IV.18. Curvas de supervivencia de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) del extracto de mora madura (300 $\mu\text{g/mL}$) a 20 °C.

Tabla IV.10. Duración de vida de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) de extracto de mora madura (300 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Resultados expresados como media \pm DE (n=3).

Tratamiento	Vida media (días)	p vs Control (log rank)	Vida máxima 10 % (días)*	p vs Control Anova
Control	$10,51 \pm 0,39$		$21,21 \pm 1,53$	
Extracto de mora madura (300 $\mu\text{g/mL}$)	$14,79 \pm 0,42$	$< 0,001$	$23,58 \pm 1,67$	$< 0,001$

*Vida máxima calculada como la duración de vida del 10 % de la población más longeva.

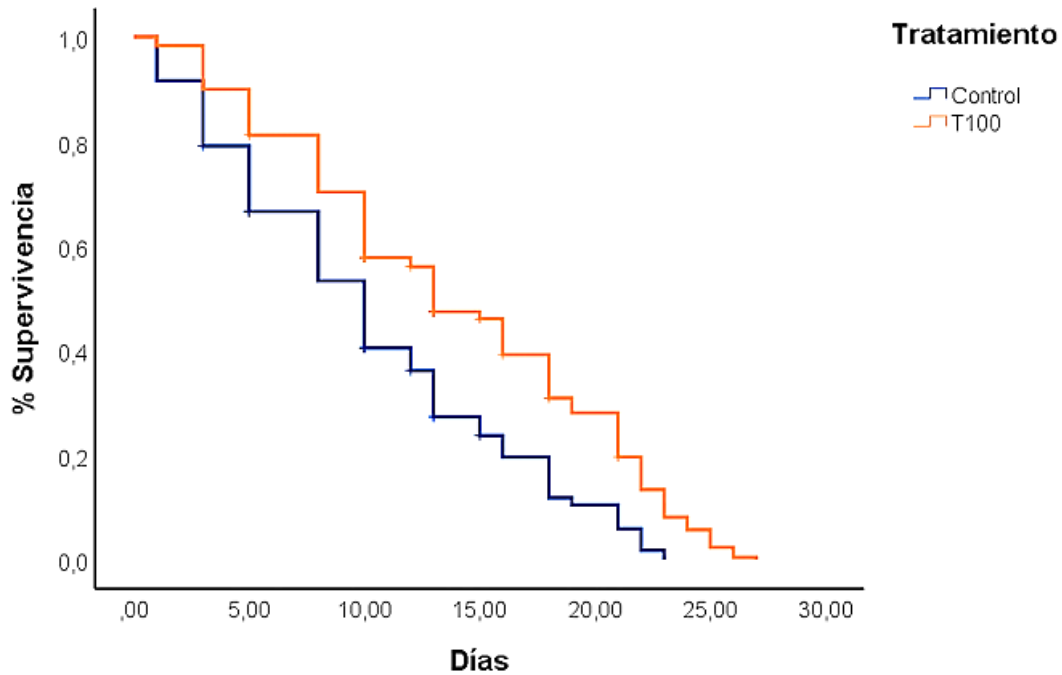


Figura IV.19. Curvas de supervivencia de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) del extracto de mora inmadura (100 µg/mL) a 20 °C.

Tabla IV.11. Duración de vida de la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en presencia y ausencia (control) de extracto de mora inmadura (100 µg/mL) en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Resultados expresados como media ± DE (n=3).

Tratamiento	Vida media (días)	<i>p</i> vs Control (log rank)	Vida máxima 10 % (días)*	<i>p</i> vs Control Anova
Control	10,24 ± 0,42		21,62 ± 0,90	
Extracto de mora inmadura (100 µg/mL)	13,90 ± 0,47	< 0,001	24,46 ± 1,19	< 0,001

*Vida máxima calculada como la duración de vida del 10 % de la población más longeva.

El conjunto de resultados obtenidos, tanto para los frutos maduros como inmaduros de mora y de mortiño, indican que la capacidad de los extractos de mejorar la resistencia al estrés térmico podría estar directamente asociada con su efecto positivo en la longevidad, probablemente mediante una mayor tolerancia al estrés oxidativo y la mitigación del daño celular acumulado en los nematodos tratados. La existencia de una posible relación entre la mejora en la

resistencia al estrés y el aumento en la duración de vida ha sido ya señalada por otros autores (Gutierrez-Zetina et al. 2021; Havermann et al. 2014; Pietsch et al. 2011). Ciertamente, la capacidad de los compuestos antioxidantes presentes en las bayas para neutralizar el estrés oxidativo, preservando la integridad celular y prolongando así la funcionalidad del organismo ha sido reportada en distintos estudios (Muscolo et al. 2024). Una observación interesante es que el aumento en la duración de vida se produce tanto para la vida media como para la máxima, lo que sugiere que los compuestos fenólicos podrían estar influyendo sobre vías moleculares asociadas con la longevidad no solo en individuos jóvenes sino también en los más longevos y, por tanto, ya naturalmente más resistentes. Hallazgos similares se han realizado por el grupo de investigación en estudios previos con extractos fenólicos de uva (Ayuda-Durán et al. 2019c) y compuestos fenólicos individuales (Gutierrez-Zetina et al. 2021; Surco-Laos et al. 2011).

Otro aspecto a señalar es que se encontraron positivos efectos significativos sobre la longevidad y la resistencia al estrés en los tratamientos con los extractos tanto de mora como de mortiño y a distintos estados de madurez, a pesar de las diferencias en la composición y contenido de polifenoles en cada caso, sugiriendo que estos compuestos poseen una capacidad robusta para influir favorablemente sobre la respuesta al estrés y la extensión de la vida en *C. elegans*. Por otra parte, aunque los extractos de frutos inmaduros tenían mayor concentración de polifenoles totales, no produjeron mejoras significativamente superiores en la longevidad ni en la resistencia al estrés que los extractos de frutos maduros, lo que subraya la importancia de la composición cualitativa y las posibles sinergias que puedan establecerse entre compuestos, como ya han señalado otros autores (Luis et al., 2018). Como ya se discutió anteriormente, en la composición de los frutos inmaduros predominan compuestos fenólicos no antocianínicos, mientras que los maduros destacan por su alto contenido de antocianinas, flavonoides para que se ha descrito una destacada capacidad antioxidante (González-Paramás et al. 2018; Tulio et al. 2008).

Estudios realizados por Wilson et al. (2006) con polifenoles de arándano (*Vaccinium angustifolium*) en la cepa silvestre de *C. elegans* mostraron un

aumento del 28 % en la vida media y una mejora de 2,5 veces en la termotolerancia, sugiriendo que estos compuestos modulan rutas celulares clave que influyen tanto sobre la resistencia al estrés como en los procesos de envejecimiento celular. Igualmente, un extracto comercial (Bioact®180) compuesto por una mezcla de bayas, frutos y raíces con un 4 % de compuestos fenólicos, ensayado por Hughes et al. (2022), condujo a un aumento del 39 % en la duración de vida de *C. elegans*, relacionado probablemente con una activación de mecanismos de defensa antioxidante. Resultados similares fueron obtenidos con extractos de frambuesa, con un incremento del 29,7 % en la vida media y una mayor resistencia tanto al estrés térmico como a la radiación UV-B (Guha et al. 2013). Estos efectos fueron atribuidos por los autores a la activación de la vía de señalización de insulina/IGF-1, regulada por el factor de transcripción DAF-16, que desempeña un papel central en la regulación de la longevidad y la respuesta al estrés oxidativo (Guha et al. 2013). Asimismo, Pandey et al. (2018) encontraron que el aceite esencial de baya de enebro producía un aumento del 18,5 % en la vida media de los nematodos y del 35,7 % en la supervivencia contra estrés térmico, probablemente mediado por la activación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y glutatión *S*-transferasa (GST).

En definitiva, los beneficios observados por el tratamiento con extractos fenólicos parecen estar intrínsecamente asociados con la activación de mecanismos celulares clave implicados en la defensa antioxidante y la regulación del envejecimiento. Entre éstas, destaca la vía de señalización de la insulina/IGF-1, con un reconocido papel en la regulación del envejecimiento y la respuesta al estrés oxidativo, que está altamente conservada desde los nematodos hasta los mamíferos, incluidos los humanos (Murphy y Hu 2013). Teniendo esto en cuenta, se realizaron ensayos para establecer la posible influencia de los compuestos estudiados sobre la expresión de genes de esta ruta, cuyos resultados se recogen en el siguiente apartado.

4.3.3. Influencia de los tratamientos con extractos de mortiño y de mora sobre genes relacionados con la resistencia al estrés y la vía de señalización de la insulina.

- **Ensayos en cepas mutantes**

Se estudió la influencia de los extractos de mora y mortiño sobre componentes de la vía de señalización de insulina/IGF-1 (IIS) empleando tanto cepas mutantes de *C. elegans* con pérdida de función en distintos genes de la ruta (*daf-16(mu8)*, *hsf-1(sy441)* y *skn-1(zu67)*) como análisis de expresión génica mediante RT-qPCR en la cepa silvestre del nematodo.

Las Figuras IV.20 y IV.21 muestran respectivamente los resultados obtenidos en la supervivencia de las cepas mutantes tras la aplicación de un estrés térmico (35 °C, 6 h) en los ensayos realizados con extractos fenólicos de mortiño y de mora, tanto maduros como inmaduros. Como se puede comprobar en las figuras, ninguno de los extractos fue capaz de aumentar la supervivencia de los gusanos con relación a sus respectivos controles, independientemente de la etapa de desarrollo del nematodo (estrés aplicado en los días 2 o 9, correspondientes a individuos jóvenes y maduros) sino que, al contrario, la tasa de supervivencia se reducía tras el tratamiento con los extractos, en algunos casos de manera significativa. El hecho de que el tratamiento con los extractos no mejore la supervivencia en los gusanos tratados sugiere que los genes en los que las cepas mutantes ensayadas muestran deficiencia desempeñan un papel relevante en el efecto protector de los compuestos fenólicos frente al estrés. La falta del gen impediría la activación de correspondiente factor de transcripción por parte de los polifenoles, necesaria para desencadenar la respuesta protectora. La disminución en la supervivencia observada en los gusanos tratados podría quizás explicarse por la posible actividad pro-oxidante que los polifenoles pueden ejercer en los sistemas biológicos, discutida en apartados anteriores, que se añadiría al estrés oxidativo provocado por el choque térmico.

En estudios anteriores de nuestro grupo realizados con extractos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) en cepas mutantes con pérdida de función para los factores de transcripción DAF-16 (factor de formación DAuer 16 anormal) y HSF-1 (factor de choque térmico 1), también se concluyó que estos factores

podrían estar implicados en la mejora en la resistencia al estrés inducida por compuestos fenólicos del arándano en individuos jóvenes, aunque no explicaban completamente los efectos en gusanos en la etapa post-reproductiva (González-Paramás et al. 2020). De manera similar, Tambara et al. (2018) en ensayos realizados en cepas mutantes de *C. elegans* deficientes en *daf-16* con extractos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), una baya originaria de Brasil con alto contenido de antocianinas, observaron que estos compuestos eran capaces de modular tanto la longevidad como el metabolismo antioxidante a través de un mecanismo dependiente de la activación de la vía de señalización DAF-16.

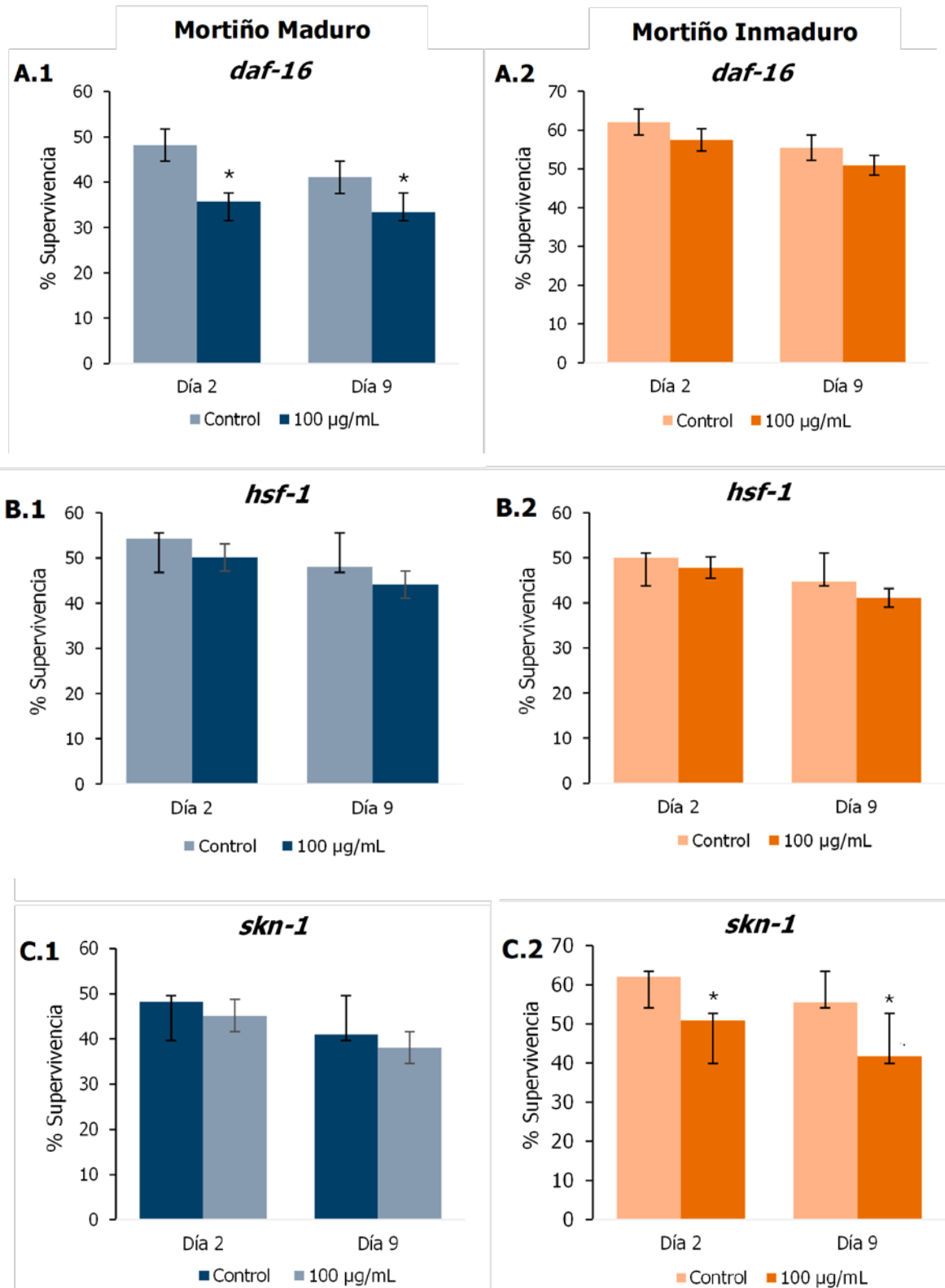


Figura IV.20. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometido a estrés térmico (35 °C, 6 h) los días 2 y 9 de adulto en diferentes cepas mutantes: *daf-16(mu86)*, *hsf-1(sy441)* y *skn-1(zu67)*, cultivadas en ausencia (controles) y en presencia de extractos de mortuño maduro (A.1, B.1 y C.1) e inmaduro (A.2, B.2 y C.2) (100 µg/mL). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media ± DE. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0,05$).

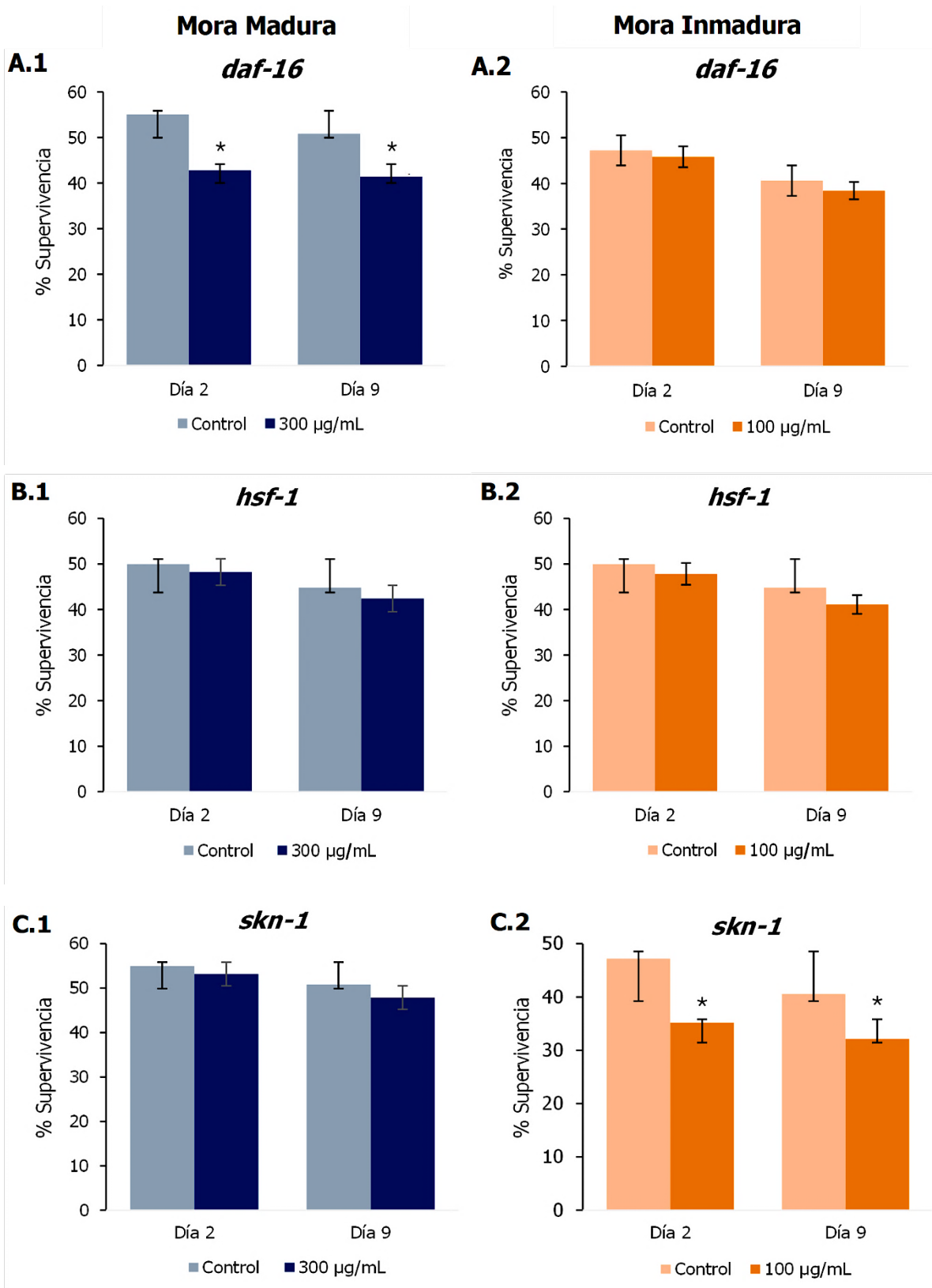


Figura IV.21. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 6 h) los días 2 y 9 de adulto en diferentes cepas mutantes: *daf-16(mu86)*, *hsf-1(sy441)* y *skn-1(zu67)*, cultivadas en ausencia (controles) y en presencia de extractos de mora madura (A.1, B.1 y C.1) (300 µg/mL) e inmadura (A.2, B.2 y C.2) (100 µg/mL). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm DE. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0,05$).

- **Ensayos de expresión génica en la cepa silvestre**

Con el objeto de explorar en mayor profundidad la participación de la ruta de la insulina/IGF-1 (IIS) en los efectos de los compuestos fenólicos se realizaron también ensayos en la cepa silvestre N2 de *C. elegans*, analizando la expresión de diversos genes de esta ruta tras el tratamiento con los extractos de mora y de mortiño, sin someter los gusanos a estrés térmico. En particular, se exploraron los genes *daf-16*, *skn-1* y *hsf-1*, y también *sod-3* (superóxido dismutasa), *gst-4* (glutación-S-transferasa), *hsp-16.2* y *hsp-70* (proteínas de choque térmico), cuya regulación depende de la translocación al núcleo de los factores de transcripción DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf2. Los resultados obtenidos se recogen en las Figuras IV.22 y IV.23.

DAF-16 es un factor de transcripción que representa el único homólogo del gen FOXO en *C. elegans*. Su función es fundamental en la regulación del envejecimiento y la longevidad en respuesta a la señalización de la vía de la insulina/IGF-1. Además, activa diversos genes que están involucrados en la respuesta al estrés celular, la longevidad, la defensa antimicrobiana y el metabolismo (Accili y Arden 2004; Murphy et al. 2003). Como se mencionó previamente, el tratamiento con extractos de mora y mortiño, tanto en su estado maduro como inmaduro, no mejoró la resistencia al estrés térmico en los gusanos mutantes *daf-16(mu86)* ni en el segundo ni en el noveno día de la etapa adulta, sugiriendo que *daf-16* podría ser un gen relevante en los efectos de los polifenoles presentes en los extractos. Esta suposición se vio apoyada por el aumento en la expresión de *daf-16* en los análisis mediante RT-qPCR en la cepa N2, donde se encontró un aumento en los niveles de ARNm de este gen en los gusanos tratados con extractos de mora (300 µg/mL) y de mortiño (100 µg/mL) maduros (Figuras IV.22 y IV.23, A y B). Estos resultados refuerzan el papel de *daf-16* en los efectos observados en *C. elegans* tratados con bayas maduras, cuya composición está caracterizada por la riqueza en antocianinas, apuntando a que el factor de transcripción DAF-16 podría desempeñar un rol determinante en la regulación de la longevidad y la resistencia al estrés inducidas por dichos compuestos.

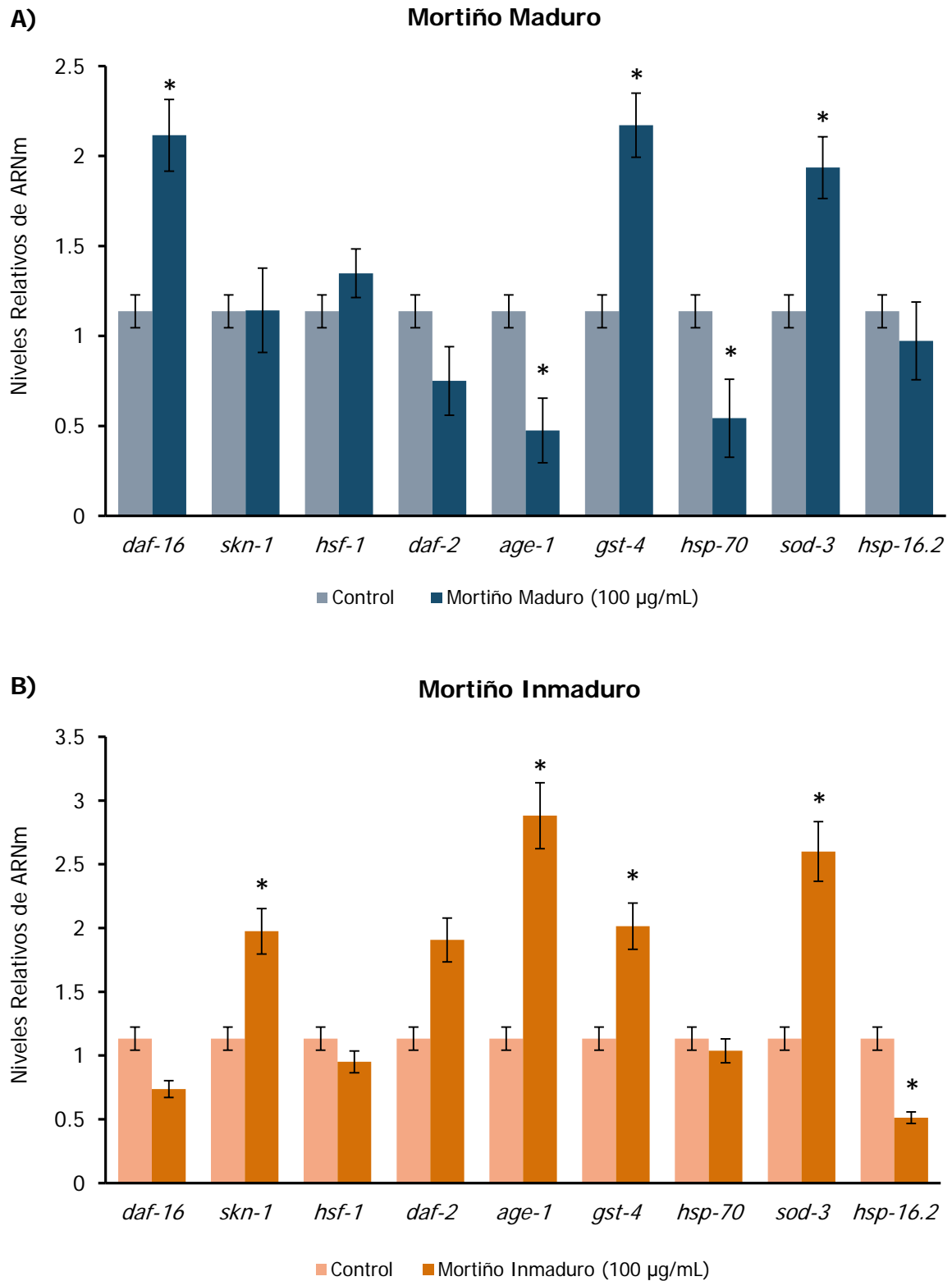


Figura IV.22 Efecto sobre la expresión de los genes *daf-16*, *skn-1*, *hsf-1*, *daf-2*, *age-1*, *gst-4*, *hsp-70*, *sod-3* y *hsp-16.2* en la cepa silvestre N2 de *C. elegans* cultivada ausencia (controles) y presencia de extractos de mortiño (A) maduro (100 µg/mL) y (B) inmaduro (100 µg/mL). El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. En cada caso, se realizaron ocho experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm DE. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

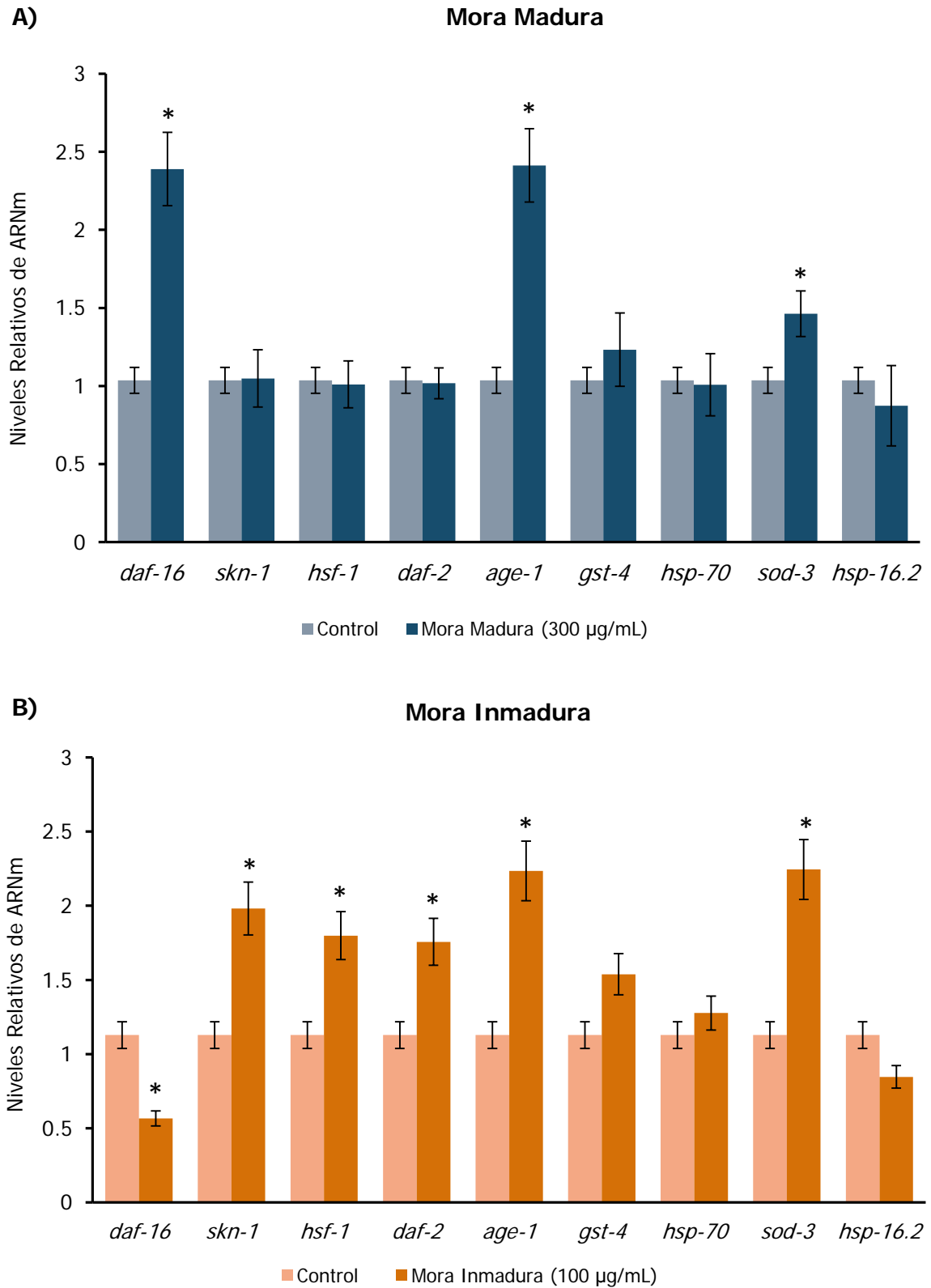


Figura IV.23. Efecto sobre la expresión de los genes *daf-16*, *skn-1*, *hsf-1*, *daf-2*, *age-1*, *gst-4*, *hsp-70*, *sod-3* y *hsp-16.2* en la cepa silvestre N2 de *C. elegans* cultivada ausencia (controles) y presencia de extractos de mora (A) madura (300 µg/mL) y (B) inmadura (100 µg/mL). El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. En cada caso, se realizaron ocho experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm DE. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

En condiciones normales, DAF-16 se encuentra en el citoplasma, pero bajo estrés se transloca al núcleo, donde activa genes relacionados con la longevidad y la resistencia al daño oxidativo. Estudios recientes en extractos de *Jujubae Fructus* (Z. Zhang et al. 2024) y *Lycium ruthenicum* Murray (Zhang et al. 2024), ricos en antocianinas, demostraron que estos extractos inducen la translocación nuclear de DAF-16, efecto que también fue vinculado a la activación del gen *sod-3*, favoreciendo la prolongación de la vida del nematodo. Estudios realizados por Wang et al. (2018) también encontraron que el tratamiento de *C. elegans* con extractos de arándano tenía un impacto significativo en la expresión de los genes *daf-16* y *sod-3*, prolongando la vida de los nematodos de manera dosis-dependiente, con un aumento de hasta el 44,4 %. Igualmente, en nuestros ensayos se encontró un aumento significativo en los niveles de expresión del gen *sod-3* en respuesta al tratamiento con bayas maduras (Figuras IV.22A y IV.23A). Este gen codifica una superóxido dismutasa, enzima antioxidante que cataliza la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno, y es una diana directa de DAF-16, dado que su promotor contiene elementos de unión específicos para DAF-16/FoxO (DBEs) (Furuyama et al. 2000).

En los tratamientos con bayas maduras, donde DAF-16 es activado, tiene sentido que *sod-3* se exprese como parte de la respuesta antioxidante, ya que DAF-16 induce directamente su transcripción en situaciones de estrés moderado. Sin embargo, también se observaron aumentos significativos en la expresión de *sod-3* en los ensayos con bayas inmaduras, en los cuales no se encontraba aumento en la expresión de DAF-16, sino que, por el contrario, se producía un descenso significativo en su expresión (Figuras IV.22B y IV.23B), sugiriendo que el efecto de los polifenoles presentes en las bayas inmaduras en la mejora de la resistencia a estrés sería independiente de este factor de transcripción. A pesar de que DAF-16 es ampliamente reconocido como un factor clave en la regulación de la longevidad y la respuesta al estrés, su translocación al núcleo no garantiza necesariamente un aumento significativo en ambos aspectos (Kenyon et al. 1993; Oh et al. 2005b). De hecho, Uno y Nishida (2016) observaron que aunque DAF-16 juega un papel central en la longevidad de *C. elegans*, su simple translocación al núcleo, necesaria para su función transcripcional, no es suficiente

por sí sola para extender significativamente la vida. En sus experimentos, la sobreexpresión de DAF-16 en gusanos de tipo silvestre (N2) resultó en un incremento insignificante en la longevidad. Esto refuerza la idea de que, aunque DAF-16 es crucial, su presencia nuclear no basta para inducir una prolongación notable de la vida sin la participación de otros factores o mecanismos complementarios.

Una posible explicación para el aumento en la expresión de *sod-3* en los ensayos con bayas inmaduras podría encontrarse en la participación del factor de transcripción SKN-1 (también sobreexpresado en esos ensayos). Este factor, aunque no regula directamente *sod-3*, puede activar otras vías antioxidantes complementarias que refuerzan la defensa celular frente al daño oxidativo, lo que indirectamente promueve la activación de *sod-3* (Tullet 2015). Además, en el tratamiento con mora inmadura, donde se observa la coexpresión de SKN-1 y HSF-1 (Figura IV.23B), se podría generar una respuesta sinérgica que amplifique la protección celular global, lo que incluiría la activación de *sod-3* como parte de la defensa antioxidante y proteotóxica. Todo ello pone de manifiesto que DAF-16 no actúa de forma aislada en la regulación de la longevidad y la respuesta al estrés.

La activación de genes específicos por DAF-16 está modulada por otros factores, como las quinasas JNK-1 y CST-1, que regulan su actividad a través de modificaciones postraduccionales (Lehtinen et al. 2006; Oh et al. 2005b). Asimismo, otras proteínas, como SIR-2.1, LIN-14, PRMT-1, RLE-1 y AAK-2, también influyen en la regulación de DAF-16 tras su translocación al núcleo, modulando la expresión génica específica y los fenotipos asociados (Berdichevsky et al. 2006; Greer et al. 2008). Realmente, la regulación de la longevidad y la resistencia al estrés mediada por la vía de señalización de insulina/IGF-1 es un proceso altamente complejo que involucra una red de actores moleculares interconectados. El hallazgo de que los extractos de bayas inmaduras parezcan influir en la regulación de genes asociados a la vía IIS sin activar directamente DAF-16 no deja, de todos modos, de ser interesante y contrasta con lo encontrado en los ensayos con bayas maduras, poniendo de manifiesto que

distintos tipos de polifenoles pueden inducir efectos beneficiosos sobre el envejecimiento y la respuesta al estrés oxidativo a través de diferentes mecanismos moleculares de acción.

DAF-2, el receptor de insulina/IGF-1, y AGE-1, una fosfatidilinositol quinasa (PI3K), participan en la señalización de la vía IIS. En el presente estudio, los niveles de ARNm de estos genes aumentan en respuesta a los extractos de bayas inmaduras (Figuras IV.22B y IV.23B), lo que apunta a la existencia de un mecanismo paralelo o alternativo no elucidado que es activado por estos extractos. Se puede especular que el aumento en la expresión de *daf-2* y *age-1* en respuesta a los extractos de bayas inmaduras podría estar relacionado con la inducción de un mayor nivel de estrés oxidativo provocado por el tipo de compuestos fenólicos presentes en estas bayas y/o las concentraciones más altas de polifenoles en las mismas, comparados con los existente en las bayas maduras. Este mayor estrés, que estaría asociado a la acción pro-oxidante de los polifenoles, podría desencadenar una respuesta celular orientada hacia la reparación y el crecimiento a corto plazo, inhibiendo simultáneamente la actividad de DAF-16, un regulador crucial de la longevidad (Kenyon 2010). De hecho, se ha demostrado que cuando la vía de señalización de insulina/IGF-1 es inhibida por factores ambientales se activan otros mecanismos dependientes de *daf-2*, pero independientes de DAF-16, que también pueden prolongar la longevidad. En contraste, las bayas maduras, con concentraciones más bajas de polifenoles y antocianinas como compuestos predominantes, podrían generar un estrés oxidativo menos intenso, lo que favorecería la activación de DAF-16 y promovería mecanismos asociados a la longevidad y la resistencia al estrés, sin necesidad de activar *daf-2* ni *age-1* (Tullet 2015).

HSF-1 es un factor de transcripción de choque térmico que regula la transcripción de genes activada tras sufrir estrés por temperatura. Su función es también crucial para la respuesta frente a proteotoxicidad, además de desempeñar un papel en el envejecimiento, la inmunidad innata y el desarrollo larvario (Morley y Morimoto 2004). Los resultados obtenidos en los análisis de RT-pPCR mostraron un aumento en la expresión de *hsf-1* en los gusanos tratados

con extractos de mora madura e inmadura y mortiño maduro, pero no en los tratados con extracto de mortiño inmaduro, para los que, por el contrario, se observó una disminución en su expresión, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos (Figuras IV.22 y IV.23). Se debe recordar que los ensayos realizados en la cepa mutante con pérdida de función en *hsf-1* ninguno de los extractos había aumentado la resistencia al estrés térmico en las dos etapas de vida del nematodo exploradas (días 2 y 9 de adulto) (Figuras IV.20 y IV.21, B.1 y B.2), sugiriendo que este gen podría estar implicado en los efectos de los extractos de bayas. Los cambios observados en los niveles de expresión de *hsf-1*, aunque no estadísticamente significativos, podrían respaldar la hipótesis de su implicación en los efectos de los polifenoles presentes en los extractos, aunque no permiten establecer una conclusión definitiva.

Una observación interesante es que en el caso de mortiño inmaduro se encontró una disminución en la expresión de *hsf-1*, a diferencia de los otros extractos de bayas. El hecho de que este extracto no aumente la expresión de *hsf-1* pero sí de manera mínima la resistencia al estrés térmico podría indicar que esta muestra contiene compuestos bioactivos que podrían actuar como inhibidores de la transcripción de *hsf-1* o afectar indirectamente los mecanismos que regulan su expresión. En este sentido, algunos autores han señalado que ciertos antioxidantes pueden inhibir respuestas al estrés al reducir por sí mismos la acumulación de especies reactivas de oxígeno, un factor clave en la activación de la respuesta de choque térmico (Sural et al. 2019; Wang et al. 2018). La presencia de una alta concentración de polifenoles con potencial capacidad antioxidante en el extracto de mortiño inmaduro podría quizás jugar un papel en este sentido y modular negativamente la activación de HSF-1. La menor concentración en polifenoles (y quizás también las diferencias en composición) en los restantes extractos ensayados podrían, por el contrario, inducir un estrés oxidativo leve y desencadenar respuestas adaptativas celulares que conduzcan a la activación de HSF-1 (Kourtis y Tavernarakis 2011).

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son chaperonas moleculares que participan en el plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas y polipéptidos tanto en condiciones fisiológicas normales como bajo estímulos estresantes, como el estrés térmico o proteotóxico (Morley y Morimoto 2004). Estas chaperonas evitan que las proteínas oxidadas o mal plegadas se agreguen, facilitando su replegamiento correcto o su degradación controlada a través de la vía de proteólisis (Hsu, Murphy, y Kenyon 2003). Los factores de transcripción regulados por la vía de señalización de insulina/IGF-1, como DAF-16, HSF-1 y SKN-1 (especialmente HSF-1), activan la expresión de genes específicos, incluidos aquellos que codifican las HSPs (Koch et al. 2014b). Diversos estudios en *C. elegans* han puesto de manifiesto la capacidad de los polifenoles para regular positivamente la expresión de genes *hsp* (Asthana, Mishra, y Pandey 2016; Upadhyay et al. 2013; Zhang et al. 2009). Con el fin de investigar el papel de estas chaperonas en los efectos de los extractos de mora y mortiño sobre la resistencia al estrés, se analizó la expresión de *hsp-16.2* y *hsp-70* mediante RT-qPCR en gusanos de la cepa silvestre N2 (Figura IV.22 y IV.23, A y B). Los resultados obtenidos mostraron que todos los extractos regularon negativamente la expresión de *hsp-16.2*. Sin embargo, la expresión de *hsp-70* aumentaba significativamente en respuesta a los extractos de bayas inmaduras, mientras que disminuía en presencia de extractos de bayas maduras. HSP-70 es una chaperona molecular clave en la respuesta al estrés proteotóxico, que contribuye a prevenir la agregación de proteínas mal plegadas y facilita su correcto plegamiento, además de responder a una amplia gama de situaciones de estrés, entre las que se incluyen las condiciones de estrés térmico y oxidativo (Hartl, Bracher y Hayer-Hartl 2011). La expresión diferencial de HSP-70 en respuesta a los extractos de mora y mortiño inmaduro, pero no a los extractos de bayas maduras, podría indicar que los compuestos fenólicos (no antocianos) presentes en las bayas inmaduras generan un estrés proteotóxico moderado pero suficiente para requerir la acción de esta chaperona. En contraste, la falta de inducción de HSP-70 en las bayas maduras sugeriría que sus polifenoles (mayoritariamente antocianos) no provocarían un estrés proteotóxico suficiente para activar esta

chaperona y, por tanto, se reduciría la necesidad de desencadenar una respuesta al estrés proteico (Li, Labbadia, y Morimoto 2018; Morimoto 2011).

La circunstancia de que los extractos de mortiño inmaduro induzcan la expresión de HSP-70 en ausencia de la activación de *hsf-1* sugiere la participación de vías alternativas en la regulación de esta chaperona. De hecho, no está claro si HSF-1 es capaz de regular la totalidad de HSPs y estudios como el de Park y Seo (2015) apuntan a una regulación más compleja y dependiente de otras vías. Se sabe, por ejemplo, que HSP-70 puede ser inducido a través de rutas no dependientes de HSF-1, como la respuesta al estrés del retículo endoplásmico mediada por los factores de transcripción XBP-1 o ATF-6, que se activan en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (Hetz 2012). Por su parte, HSP-16.2 suele activarse en condiciones de estrés térmico severo o ante una acumulación crítica de proteínas mal plegadas (Morley y Morimoto 2004). La ausencia de expresión de esta chaperona por parte de los extractos de bayas, tanto maduras como inmaduras, puede, por tanto, indicar que estos extractos no generan suficiente daño proteico para requerir la intervención de esta proteína especializada.

El conjunto de observaciones realizadas con relación al efecto de los polifenoles de las bayas sobre la activación de las proteínas de choque térmico parece reafirmar lo ya apuntado en el sentido de que no todas las HSPs responden de manera uniforme a distintos estímulos, sino que las vías involucradas en la respuesta al estrés pueden variar según la naturaleza del daño celular y el tipo de estrés al que esté sometido el organismo (Li, Labbadia y Morimoto 2018).

SKN-1, el homólogo de Nrf-2 en *C. elegans*, se ha identificado como un factor de transcripción esencial para promover la resistencia al estrés oxidativo y activar la respuesta de desintoxicación de fase II. Además de su papel en la defensa antioxidante, SKN-1 es crucial para la regulación de la homeostasis celular, incluyendo la homeostasis proteica, al facilitar la actividad del proteasoma (Blackwell et al. 2015; Kahn et al. 2008). Ninguno de los tratamientos evaluados logró mejorar la supervivencia de los mutantes *skn-1* en los períodos analizados,

correspondientes al segundo y noveno día de la fase adulta. Sin embargo, los gusanos tratados con extractos de bayas inmaduras presentaron una disminución estadísticamente significativa en la tasa de supervivencia, como se puede observar en las Figuras IV.20, IV.21, C.1 y C.2. Estos hallazgos se alinean con el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR, el cual mostró un aumento significativo en la expresión de *skn-1* en los gusanos tratados con extractos de bayas inmaduras. Por el contrario, los gusanos tratados con extractos de bayas maduras no presentaron variaciones destacables en la expresión de *skn-1* (Figuras IV.22 y IV.23, B). En conjunto, estos resultados sugieren un impacto diferencial de los extractos de bayas inmaduras sobre la expresión génica y la supervivencia de los mutantes *skn-1*.

Como se discutió previamente, el efecto de las bayas inmaduras en *C. elegans* podría ser independiente de los genes *daf-16*, lo que refuerza la posibilidad de que SKN-1 desempeñe un papel más relevante en la respuesta al estrés inducido por los polifenoles presentes en las bayas inmaduras. En *C. elegans*, la activación de DAF-16 está regulada por la inhibición de la vía de señalización de la insulina/IGF-1; en condiciones de baja señalización IIS, SKN-1 se activa a través de la vía p38 MAPK, que involucra una cascada de proteínas como NSY-1, SEK-1 y PMK-1, culminando en su fosforilación y translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, SKN-1 promueve la expresión de genes antioxidantes y de defensa celular (Ayuda-Durán et al. 2020). La fosforilación de SKN-1 por p38 MAPK no solo permite su acumulación en el núcleo, sino que también regula su interacción con elementos promotores específicos que controlan la transcripción de genes fundamentales para la defensa celular. Este mecanismo de activación está finamente modulado por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), que actúa como un regulador negativo, inhibiendo la activación constitutiva de SKN-1 al promover su exportación nuclear o su degradación. El equilibrio entre la activación por p38 MAPK y la inhibición por GSK-3 es esencial para asegurar que SKN-1 se active solo bajo condiciones de estrés adecuadas, evitando respuestas metabólicas no controladas que podrían ser perjudiciales para la célula (An et al. 2005; Inoue et al. 2005).

Por otra parte, la activación de SKN-1 no solo está vinculada a la inhibición de la vía IIS, sino que también depende de la integración de múltiples señales de estrés. En este contexto, el aumento en los niveles de calcio intracelular, común en situaciones de estrés oxidativo y metabólico, puede activar la quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II (CaMKII). Aunque el vínculo directo entre CaMKII y SKN-1 en *C. elegans* no ha sido completamente elucidado, existen indicios de que CaMKII podría desempeñar un papel crucial en la respuesta al estrés celular, influyendo en rutas de señalización como p38 MAPK. Se postula que CaMKII, al integrar las señales generadas por el aumento del calcio intracelular, facilita la activación de SKN-1 bajo condiciones de estrés oxidativo moderado o severo, promoviendo su translocación al núcleo y la activación de genes implicados en la detoxificación y la respuesta antioxidante (Ding et al. 2022; Hwang et al. 2022).

Teniendo en cuenta este conjunto de observaciones, se puede especular que los compuestos fenólicos presentes en las bayas inmaduras podrían inducir un estrés oxidativo moderado que active las vías de señalización p38 MAPK o CaMKII, facilitando la translocación de SKN-1 al núcleo, promoviendo la expresión de genes antioxidantes y de detoxificación. Esta posibilidad está respaldada por el estudio de Wilson et al. (2006), en el que se demostró que polifenoles de extractos de arándano eran capaces de prolongar la vida y mejorar la termotolerancia en *C. elegans* a través de la vía CaMKII, codificada por el gen *UNC-43*. Los resultados obtenidos por esos autores mostraron que esta activación de CaMKII era fundamental para los efectos observados, ya que en mutantes de *unc-43(n1186)*, que afectan la función de CaMKII, el tratamiento con polifenoles no lograba extender la longevidad. Además, se observó una interacción entre las vías CaMKII y p38 MAPK, sugiriendo que ambas colaboraban en la modulación de las respuestas al estrés osmótico y térmico, influyendo en la longevidad del organismo.

Una vez en el núcleo, SKN-1 activa la expresión de genes involucrados en la defensa antioxidante y la detoxificación, entre los que se destacan las glutatión S-transferasas (GSTs). Estas enzimas juegan un papel fundamental en la

neutralización del daño oxidativo. En *C. elegans*, GST-4 es una de las GSTs reguladas por SKN-1 más importantes, que facilita la detoxificación celular mediante la conjugación de compuestos tóxicos y especies reactivas de oxígeno con glutatión (Kahn et al. 2008). Debido a su relevancia en los mecanismos de defensa antioxidante, para evaluar si los extractos de bayas afectaban esta vía se analizó la expresión de *gst-4*. Los resultados mostraron que todos los extractos aumentaban la expresión de *gst-4*. Esto permite postular que los polifenoles presentes en los extractos inducirían un estrés oxidativo moderado capaz de activar SKN-1 y, en consecuencia, promover la expresión de *gst-4*, reforzando así la defensa antioxidante y facilitando la detoxificación celular (Upadhyay et al. 2013).

Es importante destacar que el factor de transcripción SKN-1 no solo regula la expresión de enzimas de fase II, sino que también promueve la síntesis de diversas proteínas antioxidantes clave, como superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (NQO-1), además de regular la producción de glutatión (Koch et al. 2014b; Tullet et al. 2008). La regulación de estos genes se lleva a cabo a través de la interacción de SKN-1 con secuencias promotoras conocidas como "elementos de respuesta antioxidante" (ARE). Genes que contienen ARE, como *gst-4*, han sido identificados como objetivos directos de SKN-1, lo que subraya su papel crucial en la activación de mecanismos de defensa antioxidante (Kahn et al. 2008; Van-Raamsdonk y Hekimi 2010). Este control sobre una red amplia de genes antioxidantes posiciona a SKN-1 como un regulador central en la protección celular frente al estrés oxidativo.

Se ha sugerido que la coactivación de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1 añade una mayor complejidad a la regulación de *gst-4*. Aunque DAF-16 no regula directamente este gen, se ha planteado que su activación potencia la expresión de otros genes antioxidantes que, junto con SKN-1, refuerzan las defensas celulares (Tullet et al. 2017). Esta interacción sinérgica entre DAF-16 y SKN-1 podría explicar la persistente expresión de *gst-4* en los gusanos tratados con extractos de bayas maduras, a pesar de que el nivel de

estrés oxidativo inducido por los polifenoles presentes sea menor en comparación con las bayas inmaduras. La acción cooperativa entre DAF-16 y SKN-1 haría que, incluso bajo condiciones de menor estrés oxidativo, las defensas celulares permanezcan activas. Además, HSF-1 podría jugar un papel indirecto en la protección celular, ya que contribuye a la estabilización de proteínas y al mantenimiento de la homeostasis proteica, lo que podría coordinarse con la actividad de SKN-1, aunque no regule directamente *gst-4* (Morley y Morimoto 2004). Esta posibilidad de cooperación entre DAF-16, SKN-1 y otros factores protectores ha sido corroborada en estudios en *C. elegans* con extractos de cereza ácida (Jayarathne et al. 2020) y de frambuesa (Song et al. 2020), que han permitido demostrar que los compuestos fenólicos presentes en estos frutos favorecen la translocación nuclear de DAF-16 y activan la expresión de genes antioxidantes, como *sod-3*, *gst-4* y *skn-1*.

V. CONCLUSIONES GENERALES

Se obtuvieron y caracterizaron extractos fenólicos de frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), recolectados en la zona andina de Ecuador, en tres estados de madurez y a dos niveles de altitud: 2360 y 3200 (m.s.n.m) para la mora y 2836 y 3641 (m.s.n.m) para el mortiño.

En la mora se identificaron, de manera tentativa, 30 compuestos, principalmente flavonoles, elagitaninos y derivados del ácido elágico, mientras que en el mortiño se detectaron 14 compuestos. En ambos frutos, los flavonoles y antocianos, como cianidina, delphinidina y perlargonidina, destacaron como los fenoles más abundantes.

Los extractos obtenidos de frutos recolectados a gran altitud presentaron concentraciones significativamente mayores de compuestos bioactivos independientemente del estado de madurez, en comparación con los obtenidos a menor altitud. Particularmente, en las etapas iniciales de maduración se observaron los niveles más altos de polifenoles totales y flavonoides, mientras que el contenido de antocianinas alcanzó su punto máximo en la madurez completa. De manera similar, la capacidad antioxidante *in vitro*, evaluada mediante ensayos diseñados para medir la actividad reductora y/o neutralizante de radicales libres, aumentó con la altitud, aunque disminuía a medida que los frutos maduraban. En contraste, a altitudes más bajas, estos valores permanecieron constantes a lo largo de las diferentes etapas de maduración. Estos resultados sugieren que las condiciones geográficas y climáticas asociadas a la altitud desempeñan un papel crucial en la modulación del proceso de maduración, así como en el perfil fenólico de los frutos analizados.

Se investigaron los efectos de extractos de mora y mortiño, sobre la longevidad, la resistencia al estrés térmico y la expresión de genes relacionados en *Caenorhabditis elegans*, tanto en la cepa silvestre N2 como en mutantes de DAF-16, HSF-1 y SKN-1

En todos los casos, los extractos mostraron efectos protectores frente al estrés oxidativo y aumentaron de modo significativo la duración de vida media y máxima de *C. elegans*. Estos efectos estaban, al menos parcialmente, relacionados con la capacidad de los extractos para modular distintas etapas de

la ruta de la insulina. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los que se inducían los efectos eran diferentes para cada tipo de muestra.

En el caso de los extractos de frutos inmaduros, caracterizados por su alta concentración de metabolitos secundarios como flavonoles y ácidos fenólicos, se observó una disminución en la expresión de *daf-16*. En contraste, los extractos de frutos maduros, con elevada presencia de antocianinas, destacaron por aumentar la expresión de *daf-16* y de genes diana como *sod-3*, importantes para mitigar el daño oxidativo acumulativo. Por otra parte, los extractos de frutos inmaduros indujeron un aumento significativo en la expresión de *hsp-70*, una chaperona esencial para la estabilización y reparación de proteínas que, sin embargo, no era observada en los extractos de frutos maduros. Ninguno de los extractos indujo la expresión de *hsp-16.2*. En todos los extractos, independientemente de su madurez, se encontró un aumento en la expresión de *gst-4*. Este gen, involucrado en la detoxificación celular, refleja la capacidad general de los extractos para activar mecanismos de protección frente al daño celular. En los extractos inmaduros, esta activación se complementó con un incremento en la expresión de *daf-2* y *age-1*. El hecho de que se observen mecanismos de acción diferentes dependiendo de la composición de las muestras sugiere la versatilidad de los compuestos fenólicos en la regulación de procesos celulares.

En los ensayos realizados en cepas mutantes *knock out* DAF-16, HSF-1 y SKN-1 de *C. elegans*, ninguno de los extractos mostró capacidad para mitigar el estrés oxidativo inducido térmicamente, sino que, al contrario, la tasa de supervivencia se reducía tras el tratamiento. El hecho de que los extractos fenólicos no mejoren la supervivencia en los gusanos, sugiere que los genes en los que las cepas mutantes ensayadas mostraban deficiencia desempeñan un papel relevante en el efecto protector de los compuestos fenólicos frente al estrés. La falta del gen impediría la activación del correspondiente factor de transcripción por parte de los polifenoles, necesaria para desencadenar la respuesta protectora. La disminución en la supervivencia observada en los gusanos tratados podría quizás explicarse por la posible actividad pro-oxidante

que los polifenoles pueden ejercer en los sistemas biológicos, incrementando el estrés oxidativo provocado por el choque térmico.

Los resultados obtenidos reflejan cómo la composición fitoquímica de los frutos, determinada por su madurez, puede influir sobre los efectos producidos en relación con la protección frente al estrés oxidativo y la modulación de la longevidad, determinando los mecanismos moleculares a través de los cuales actúan los distintos tipos de compuestos fenólicos presentes en las bayas. La observación de que las frutas inmaduras y, por tanto, no comestibles, también muestren efectos potencialmente beneficiosos proporciona un marco integral para el empleo de este tipo de productos en posibles aplicaciones nutracéuticas, como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales y, en su caso, terapéuticas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Accili, Domenico; Arden, Karen. 2004. «FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation». *Cell* 117(4): 421-26.
- Adlercreutz, Herman. 2007. 44 Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences *Lignans and human health*.
- Agati, Giovanni; Brunetti, Cecilia; Di Ferdinando, Martina; Ferrini, Francesco; Pollastri, Susanna; Tattini Agati, Massimiliano. 2013. «Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past». *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 35-45.
- Aguilar, Zornitza; Ulloa, Carmen; Hidalgo, Pamela. 2001. *Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta , Ecuador*. Imbabura: Proyecto Páramo Andino.
- Aita, Sara Elsa et al. 2021. «Andean blueberry of the genus *Disterigma*: A high-resolution mass spectrometric approach for the comprehensive characterization of phenolic compounds». *Separations* 8(5).
- Åkerström, Andreas; Jaakola, Laura; Bång, Ulla; Jäderlund, Anders. 2010. «Effects of latitude-related factors and geographical origin on anthocyanidin concentrations in fruits of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberries)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(22): 11939-45.
- Akhatou, Ikram; Fernández-Recamales, Ángeles. 2014. «Nutritional and nutraceutical quality of strawberries in relation to harvest time and crop conditions». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(25): 5749-60.
- Alarcón-Barrera, Karina S. et al. 2018. «Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage». *Journal of Berry Research* 8(3): 223-36.
- Altintas, Ozlem; Park, Sangsoon; Jae Lee, Seung. 2016. «The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*». *BMB Reports* 49(2): 81-92.

- Alvarez-Suarez, José M; Cuadrado, Carmen; Redondo, Isabel; Giampieri, Francesca; González-Paramás, Ana M; Santos-Buelga, Celestino. 2021. «Novel approaches in anthocyanin research - Plant fortification and bioavailability issues». *Trends in Food Science and Technology* 117: 92-105.
- An, Jae Hyung et al. 2005. «Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(45): 16275-80.
- An, Jae Hyung; Blackwell, T. Keith. 2003. «SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response». *Genes and Development* 17(15): 1882-93.
- Ancillotti, Claudia et al. 2017. «Liquid chromatographic/electrospray ionization quadrupole/time of flight tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of different *Vaccinium* berry species and their comparative evaluation». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(5): 1347-68. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-0067-y>.
- Anttonen, Mikko J; Karjalainen, Reijo O. 2005. «Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry». *Journal of Food Composition and Analysis* 18(8): 759-69.
- Apak, Reşat; Gorinstein, Shela; Böhm, Volker; Schaich, Karen; Özyürek, Mustafa; Güçlü, Kubilay. 2013. «Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)». *IUPAC Analytical Chemistry Division* 85(5): 957-98.
- Arozarena, Íñigo et al. 2012. «Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(30): 7463-73.
- Arts, Ilja; Sesink, Aloys; Faassen-Peters, Maria; Hollman, Peter. 2004. «The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides». *British Journal*

- of Nutrition* 91(6): 841-47.
- Asthana, Jyotsna; Mishra, B. N; Pandey, Rakesh. 2016. «Acacetin promotes healthy aging by altering stress response in *Caenorhabditis elegans*». *Free Radical Research* 50(8): 861-74.
- Aura, Anna Marja. 2008. «Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon». *Phytochemistry Reviews* 7(3): 407-29.
- Avery, Leon; Shtonda, Boris B. 2003. «Food transport in the *C. elegans* pharynx». *The Journal of Experimental Biology* 206: 2441-57.
- Ávila Rodríguez, Hernán Guillermo; Cuspoca Riveros, Julián Andrés; Fischer, Gerhard; Ligarreto Moreno, Gustavo Adolfo; Quicazán de Cuenca, Martha Cecilia. 2007. «Caracterización Físicoquímica y Organoléptica del fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) Almacenado 1 A 2°C». *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 60(2): 4179-93.
- Ayala, Germán; Jácome, Rosendo; Martínez, Aníbal; Villares, Mercy; Viteri, Pablo; Hinojosa, Milton. 2016. «El cultivo de mora en el Ecuador». En *INIAP*, 105-13.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4057/1/iniapscCD104p39.pdf>.
- Ayuda-Durán, Begoña et al. 2019. «Antioxidant characterization and biological effects of grape pomace extracts supplementation in *caenorhabditis elegans*». *Foods* 8(2): 1-14.
- Ayuda-Durán, Begoña; González-Manzano, Susana; Miranda-Vizueté, Antonio; Dueñas, Montserrat; Santos-Buelga, Celestino; González-Paramás, Ana M. 2019. «Epicatechin modulates stress-resistance in *C. Elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway». *PLoS ONE* 14(1): 1-26.
- Ayuda-Durán, Begoña et al. 2019. «Exploring target genes involved in the effect of quercetin on the response to oxidative stress in *caenorhabditis elegans*». *Antioxidants* 8(12): 1-17.

- Ayuda-Durán, Begoña; Sánchez-Hernández, Eva; González-Manzano, Susana; Santos-Buelga, Celestino; González-Paramás, Ana M. 2022. «The effects of polyphenols against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* are determined by coexisting bacteria». *Frontiers in Nutrition* 9: 1-13.
- Ayuda-Durán, Begoña; Garzón-García, Lidia; González-Manzano, Susana; Santos-Buelga, Celestino; González-Paramás, Ana M. 2024. «Insights into the Neuroprotective Potential of Epicatechin: Effects against A β -Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*». *Antioxidants* 13(1): 1-17.
- Ayuda-Durán, Begoña; González-Manzano, Susana; González-Paramás, Ana M; Santos-Buelga, Celestino. 2020. *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism to Evaluate the Antioxidant Effects of Phytochemicals». *Molecules* 25(14): 1-23.
- Baenas, Nieves et al. 2020. «Characterization of andean blueberry in bioactive compounds, evaluation of biological properties, and in vitro bioaccessibility». *Foods* 9(10).
- Bapteste, Eric et al. 2023. «Expanding evolutionary theories of ageing to better account for symbioses and interactions throughout the Web of Life». *Ageing Research Reviews* 89: 1-16.
- Beekwilder, Jules; Jonker, Harry; Meesters, Patrick; Hall, Robert D; Van Der Meer, Ingrid M; De Vos, C. H.Ric. 2005. «Antioxidants in raspberry: On-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(9): 3313-20.
- Benedetto, Svetlana Di; Müller, Ludmila. 2019. «Aging, Immunity, and Neuroinflammation: The Modulatory Potential of Nutrition». En *Nutrition and Immunity*, 301-22.
- Bento-Silva, Andreia et al. 2019. «Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability?». *European Journal of Nutrition* 59(4): 1275-93.
<https://doi.org/10.1007/s00394-019-01987-6>.

- Benzie, Iris; Strain, J. J. 1996. «The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay». *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Berdichevsky, Ala; Viswanathan, Mohan; Horvitz, H. Robert; Guarente, Leonard. 2006. «C. elegans SIR-2.1 Interacts with 14-3-3 Proteins to Activate DAF-16 and Extend Life Span». *Cell* 125(6): 1165-77.
- Bilawal, Akhunzada et al. 2021. «A review of the bioactive ingredients of berries and their applications in curing diseases». *Food Bioscience* 44: 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101407>.
- Bird, Alan; Bird, Jean. 1991. «Musculature». En *The structure of nematodes*, , 106-28.
- Blackwell, Keith et al. 2015. «SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in Caenorhabditis elegans». *Free Radical Biology and Medicine* 88: 290-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008>.
- Blackwell, Keith; Bowerman, Bruce; Priess, James; Weintraub, Harold. 1994. «Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements». *Science* 266: 621-28.
- Blackwell, Keith et al. 2015. «SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in Caenorhabditis elegans». *Free Radical Biology and Medicine* 88: 290-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008>.
- Blokhina, Olga; Virolainen, Eija; Fagerstedt, Kurt. 2003. «Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review». *Annals of Botany* 91: 179-94.
- Bobinait, Ramun; Viškelis, Pranas; Venskutonis, Petras Rimantas. 2012. «Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (Rubus spp.) cultivars». *Food Chemistry* 132(3): 1495-1501.

- Bondet, V; Brand-Williams, W; Berset, C. 1997. «Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method». *Food Science and Technology* 30: 609-15.
- Borges, Cristine Vanz; Minatel, Igor Otavio; Gomez-Gomez, Hector Alonzo; Pereira Lima, Giuseppina Pace. 2017. «Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites». *Medicinal Plants and Environmental Challenges*: 259-77.
- Brenner, S. 1973. «The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*». *Genetics* 77: 71-94.
- Brodowska, Katarzyna Małgorzata. 2017. «European Journal of Biological Research Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues». *European Journal of Biological Research* 7(2): 108-23. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.545778>.
- Brunet, Anne et al. 2004. «Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase». *Science* 303: 2011-15.
- Buechner, Matthew; Yang, Zhe; Al-Hashimi, Hikmat. 2020. «A Series of Tubes: The *C. elegans* Excretory Canal Cell as a Model for Tubule Development». *Journal of Developmental Biology* 8(17): 1-18.
- Buijsse, Brian; Feskens, Edith; Kok, Frans; Kromhout, Daan. 2015. «Cocoa Intake, Blood Pressure, and Cardiovascular Mortality». *American Medical Association* 166: 410-17.
- Bujor, Oana Crina et al. 2016. «Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity». *Food Chemistry* 213: 58-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.042>.
- Burdulis, Deividas et al. 2009. «Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*vaccinium myrtillus* l.) And blueberry (*Vaccinium corymbosum* l.) Fruits». *Drug Research* 66(4): 399-408.

- Cabrera, Mauricio et al. 2007. «Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships». *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15(10): 3356-67.
- Cai, Wai Jiao et al. 2011. «Icariin and its derivative icariside II extend healthspan via insulin/IGF-1 pathway in *C. elegans*». *PLoS ONE* 6(12).
- Campra, Pablo et al. 2019. «A whole-food approach to the in vitro assessment of the antitumor activity of gazpacho». *Food Research International* 121(November): 441-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.058>.
- Candela, Rossella G. et al. 2021. «Conversion of organic dyes into pigments: Extraction of flavonoids from blackberries (*Rubus ulmifolius*) and stabilization». *Molecules* 26(20): 1-13.
- Cardona, Fernando et al. 2013. «Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health». *Journal of Nutritional Biochemistry* 24(8): 1415-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>.
- Carrillo-Perdomo, E. et al. 2015. «Andean berries from Ecuador: A review on botany, agronomy, chemistry and health potential». *Journal of Berry Research* 5(2): 49-69.
- Cassidy Aedin; Hanley, Bryan; Lamuela-Raventos, Rosa. 2000. «Isoflavones, lignans and stilbenes - Origins, metabolism and potential importance to human health». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 1044-1062.
- Cerdá, Begoña; Tomás-Barberán, Francisco A; Espín, Juan Carlos. 2005. «Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: Identification of biomarkers and individual variability». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(2): 227-35.

- Cerrato, Andrea et al. 2022. «Detailed investigation of the composition and transformations of phenolic compounds in fresh and fermented *Vaccinium floribundum* berry extracts by high-resolution mass spectrometry and bioinformatics». *Phytochemical Analysis* 33(4): 507-16.
- Cevallos, Luis. 2020. Universidad Agraria del Ecuador «Manejo agronómico del cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*)». http://www.uagraria.edu.ec/carrera_medicina_veterinaria.php.
- Chen, Jing; Zhang, Zhiguo; Cai, Lu. 2014. «Diabetic cardiomyopathy and its prevention by Nrf2: Current status». *Diabetes and Metabolism Journal* 38(5): 337-45.
- Chen, Wen et al. 2022. «Cyanidin-3-O-glucoside promotes stress tolerance and lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* exposed to polystyrene via DAF-16 pathway». *Mechanisms of Ageing and Development* 207: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2022.111723>.
- Cheng, Yingying et al. 2023. «Advances in embedding techniques of anthocyanins: Improving stability, bioactivity and bioavailability». *Food Chemistry* 20: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100983>.
- Cherrak, Sabri Ahmed et al. 2016. «In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation». *PLoS ONE* 11(10): 1-21.
- Chiang, Wei Chung et al. 2012. «HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity». *Cell* 148: 322-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.019>.
- Chisholm, Andrew; Hsiao, Tiffany. 2013. «The *C. elegans* epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth». *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 1-25.

- Cho, Mi Jin; Howard, Luke R; Prior, Ronald L; Clark, John R. 2005. «Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(13): 2149-58.
- Chung, Min Yu; Hwang, Jin Taek; Lee, Jangho; Choi, Hyo Kyoung. 2022. «The Anti-Cancer Effects of Red-Pigmented Foods: Biomarker Modulation and Mechanisms Underlying Cancer Progression». *Applied Sciences (Switzerland)* 12(5): 1-17.
- Claudio Martins, Luís; Soares, Samara; Rocha, Fábio. 2023. «Digital-image eco-friendly spot test with liquid-liquid microextraction for selective determination of flavonols in berries». *Microchemical Journal* 193: 1-7.
- Clifford, M. N. 2004. «Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health». *Planta Medica* 70(12): 1103-14.
- Cobo, María Mercedes; Gutiérrez, Bernardo; Torres, Andrés; Torres, María de Lourdes. 2016. «Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)». *Biochemical Systematics and Ecology* 64: 14-21.
- Cook, Steven et al. 2019. «Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes». *Nature* 571: 1-75. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>.
- Corsi, Ann K; Wightman, Bruce. 2015. «A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*». En *Genetics: WormBook*, , 387-407.
- Czank, Charles et al. 2013. «Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ¹³C-tracer study». *American Journal of Clinical Nutrition* 97(5): 995-1003.
- D-maps. 2008. «Ecuador: Provincias». webmaster@d-maps.com
- Dai, Qi et al. 2006. «Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Project». *American Journal of Medicine* 119(9): 751-59.

- Dalgo, Monica Arteaga; Andrade Cuvi, Maria Jose; Moreno Guerrero, Carlota. 2014. 5 Universidad Tecnológica Equinoccial «Development relationship of color with anthocyanins and chlorophyll content in different degrees of maturity of mortiño (*Vaccinium floribundum*)».
- Day, Andrea et al. 2000. «Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase». *FEBS Letters* 468: 166-70.
- Del-Castillo-Alonso, María Ángeles et al. 2016. «Effects of ambient solar UV radiation on grapevine leaf physiology and berry phenolic composition along one entire season under Mediterranean field conditions». *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 374-86.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.018>.
- Dewanto, Veronica; Xianzhong, Wu; Adom, Kafui; Liu, Rui Hai. 2002. «Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3010-14.
- Dimov, Ivan; Maduro, Morris F. 2019. «The *C. elegans* intestine : organogenesis , digestion , and physiology». *Cell Tissue Res*: 1-14.
- Ding, Chen; Wu, Youjun; Dabas, Hadas; Hammarlund, Marc. 2022. «Activation of the CaMKII-Sarm1-ASK1-p38 MAP kinase pathway protects against axon degeneration caused by loss of mitochondria». *eLife* 11: 1-38.
- Donovan, Jennifer L; Manach, Claudine; Faulks, Richard; Kroon, Paul. 2007. «Plant secondary metabolites.» *Plant Secondary Metabolites* 393: 1-122.
- Dueñas, Montserrat et al. 2013. «Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*». *Pharmacological Research* 76: 41-48.
- Dueñas, Montserrat et al. 2015. «Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: From isolated cultures to omic approaches». *Antioxidants* 4(1): 1-21.

- Dvaranauskaite, A, P. R Venskutonis, y J Labokas. 2006. «Radical scavenging activity of raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit extracts». *Acta Alimentaria* 35(1): 73-83.
- Enomoto, Hirofumi. 2021. «Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging». *Current Research in Food Science* 4: 821-28. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.11.006>.
- Erlund, I. et al. 2000. «Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers». *European Journal of Clinical Pharmacology* 56(8): 545-53.
- Erlund, Iris et al. 2003. «Consumption of black currants, lingonberries and bilberries increases serum quercetin concentrations». *European Journal of Clinical Nutrition* 57(1): 37-42.
- Erlund, Iris; Freese, Riitta; Marniemi, Jukka; Hakala, Paula; Alfthan, Georg. 2006. «Bioavailability of quercetin from berries and the diet». *Nutrition and Cancer* 54(1): 13-17.
- Espín, Juan Carlos; García-Conesa, María Teresa; Tomás-Barberán, Francisco A. 2007. «Nutraceuticals: Facts and fiction». *Phytochemistry* 68: 2986-3008.
- Esquivel-Alvarado, Daniel et al. 2020. «Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical *Vaccinium* Species from Costa Rica». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(10): 2872-79.
- Fares, Hanna; Grant, Barth 2002. «Deciphering Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*». *Traffic* (8): 11-19.
- Faria, Ana et al. 2005. «Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(17): 6896-6902.
- Feliciano, Rodrigo et al. 2017. «Absorption, metabolism and excretion of cranberry (poly)phenols in humans: A dose response study and assessment of inter-individual variability». *Nutrients* 9(268): 1-11.

- Félix, Marie. 2010. «The natural history of *Caenorhabditis elegans*». *Current Biology* 20(22): 65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>.
- Feng, Cheng Yong et al. 2017. «Polyphenol profile and antioxidant activity of the fruit and leaf of *Vaccinium glaucoalbum* from the Tibetan Himalayas». *Food Chemistry* 219: 490-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.083>.
- Fernandez, Tereza; Mira, Lurdes; Florêncio, Helena; Jennings, Keith. 2002. «Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study». *Journal of Inorganic Biochemistry* 92(2): 105-11.
- Fischer, Gerhard; Parra-Coronado, Alfonso; Balaguera-López, Helber Enrique. 2022. «Altitude as a determinant of fruit quality with emphasis on the Andean tropics of Colombia. A review.» *Agronomía Colombiana* 40(2): 70-85.
- Foroutani, Zahra et al. 2024. «Application of deep eutectic solvents in the extraction of anthocyanins: Stability, bioavailability, and antioxidant property». *Trends in Food Science and Technology* 144: 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104324>.
- Fraga, Cesar. 2009. *Plant Phenolics and Human Health Plant Phenolics and Human Health*.
- Fraga, Cesar; Galleano, Monica; Verstraeten, Sandra; Oteiza, Patricia. 2010. «Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols». *Molecular Aspects of Medicine* 31(6): 435-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>.
- De Freitas Rodrigues et al. 2021. «Goji berry (*Lycium barbarum* L.) juice reduces lifespan and premature aging of *Caenorhabditis elegans*: Is it safe to consume it?» *Food Research International* 144: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110297>.

- Furuyama, Tatsuo; Nakazawa, Toru; Nakano, Itsuko; Mori, Nozomu. 2000. «Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues». *Biochemical Journal* 349(2): 629-34.
- Gallardo-Puente, Carlos. 2015. *Mortino. La Perla de los Andes*. ed. Universidad de las Américas. Quito: Universidad de las Américas.
- Garzón, G. Astrid et al. 2020. «Phenolic profile, in vitro antimicrobial activity and antioxidant capacity of *Vaccinium meridionale swartz* pomace». *Heliyon* 6(5): 1-8.
- Ghorbanpour, Mansour; Varma, Ajit. 2017. Medicinal Plants and Environmental Challenges *Medicinal plants and environmental challenges*. eds. Mansour Ghorbanpour y Ajit Varma. Cham: Springer Nature.
- Gómez, Karman. 2012. «Provincias de la Sierra». *Nord West*. <https://ec.viajandox.com/provincias-de-la-sierra-PV43>.
- González-Barrio, Rocío; Borges, Gina; Mullen, William; Crozier, Alan. 2010. «Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 3933-39.
- González-Manzano, Susana et al. 2012. «Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8911-16.
- González-Paramás, Ana M. et al. 2020. «Assessment of the in vivo antioxidant activity of an anthocyanin-rich bilberry extract using the *Caenorhabditis elegans* model». *Antioxidants* 9(6): 1-16.
- González-Paramás, Ana M et al. 2018. «The Mechanisms Behind the Biological Activity of Flavonoids». *Current Medicinal Chemistry* 26(39): 6976-90.
- Goodman, Miriam B; Schwarz, Erich M. 2003. «Transducing Touch in *Caenorhabditis Elegans*». *Annual Review of Physiology* 65(1): 553-78.

- Gramza-Michałowska, Anna et al. 2019. «Phenolic compounds and multivariate analysis of antiradical properties of red fruits». *Journal of Food Measurement and Characterization* 13(3): 1739-47. <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-019-00091-x>.
- Gramza-Michałowska, Anna; Sidor, Andrzej; Kulczyński, Bartosz. 2017. «Berries as a potential anti-influenza factor – A review». *Journal of Functional Foods* 37: 116-37.
- Greer, Eric et al. 2007. «An AMPK-FOXO Pathway Mediates Longevity Induced by a Novel Method of Dietary Restriction in *C. elegans*». *Current Biology* 17(19): 1646-56.
- Greer, Eric et al. 2008. «An AMPK-FOXO pathway mediates the extension of lifespan induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*». *Curr Biol* 17(19): 1646-56.
- Grünz, Gregor et al. 2012. «Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*». *Mechanisms of Ageing and Development* 133: 1-10.
- Guedes, Mayara Neves Santos et al. 2017. «Atividade antioxidante e fenóis totais de amoras-pretas cultivadas em clima tropical de altitude». *Acta Scientiarum - Agronomy* 39(1): 43-48.
- Guerrero-Chavez, Guillermo; Scampicchio, Matteo; Andreotti, Carlo. 2015. «Influence of the site altitude on strawberry phenolic composition and quality». *Scientia Horticulturae* 192: 21-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.017>.
- Guevara-Teran, Mabel. 2022. «Influence of altitude on the physicochemical composition and antioxidant capacity of strawberry : a preliminary systematic review and meta-analysis». *Phytochem review* 34: 1'18.
- Guha, Sujay et al. 2013. «The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *daf-16* and *osr-1*». *Age* 35(5): 1559-74.

- Guirado, Orlando Abreu; Cuéllar, Armando; Prieto, Sylvia. 2008. «Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae) Phytochemistry of genus *Vaccinium* (Ericaceae)». *Revista Cubana de Plantas Medicinales*: 1-11.
- Gutierrez-Zetina, Sofia M. et al. 2021. «Caffeic and dihydrocaffeic acids promote longevity and increase stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by modulating expression of stress-related genes». *Molecules* 26(6): 1-16.
- Halliwell, Barry. 2008. «Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476(2): 107-12.
- Halliwell, Barry; Gutteridge, John. 1998. *Free radicals in biology and medicine*. Third. Oxford: University Press.
- Hartl, F. Ulrich; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit. 2011. «Molecular chaperones in protein folding and proteostasis». *Nature* 475: 324-32.
- Havermann, Susannah; Chovolou, Yvonne; Humpf, Hans Ulrich; Wätjen, Wim. 2014. «Caffeic acid phenylester increases stress resistance and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulation of the insulin-like DAF-16 signalling pathway». *PLoS ONE* 9(6): 1-11.
- Hayes, John; Dinkova-Kostova, Albena. 2014. «The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism». *Trends in Biochemical Sciences* 39(4): 199-218.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>.
- Hedgecock, Edward; White, John. 1985. «Polyploid Tissues in the Nematode *Caenorhabditis*». *Developmental Biology* 107: 128-33.
- Heim, Kelly E.; Tagliaferro, Anthony R; Bobilya, Dennis J. 2002. «Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships». *Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10): 572-84.
- Hervet-Hernández, D; Goñi, I. 2011. «Dietary polyphenols and human gut microbiota: A review». *Food Reviews International* 27(2): 154-69.

- Hervert-Hernández, Deisy; Pintado, Concepción; Rotger, Rafael; Goñi, Isabel. 2009. «Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth». *International Journal of Food Microbiology* 136(1): 119-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.016>.
- Hetz, Claudio. 2012. «The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(2): 89-102.
- Hirschey, Matthew D. 2013. «C. elegans Sirtuins». En *Sirtuins: Methods and Protocols*, ed. Matthew Hirschey. Durham, 39-56.
- Hobert, Oliver. 2010. «Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*». *WormBook*: 1-24.
- Hodgkin, Jonathan. 2005. «The Online Review of C. elegans Biology». *WormBook*: 1-3.
- Hollman, Peter et al. 2011. «The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established». *Journal of Nutrition* 141(5): 989-1009.
- Hong, Yun Jeong; Mitchell, Alyson E. 2006. «Identification of glutathione-related quercetin metabolites in humans». *Chemical Research in Toxicology* 19(11): 1525-32.
- Hope, I.A. 1999. «A practical approach. The practical approach series». *University of Leeds Oxford*.
- Horanni, Rouba; Engelhardt, Ulrich H. 2013. «Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products». *Journal of Food Composition and Analysis* 31(1): 94-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.03.005>.
- Van Der Horst, Armando et al. 2004. «FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2/SIRT1». *Journal of Biological Chemistry* 279(28): 28873-79.

- Horvitz, Sandra; Chanaguano, Diana; Arozarena, Iñigo. 2017. «Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions». *Scientia Horticulturae* 226: 293-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.002>.
- Hsu, Ao Lin; Murphy, Coleen; Kenyon, Cynthia. 2003. «Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor». *Science* 300: 1142-45.
- Huang, Dejian; Boxin, O. U; Prior, Ronald L. 2005. «The chemistry behind antioxidant capacity assays». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 1841-56.
- Hughes, Samantha et al. 2022. «An extract of Rosaceae, Solanaceae and Zingiberaceae increases health span and mobility in *Caenorhabditis elegans*». *BMC Nutrition* 8(1): 1-12.
- Hwang, Min; Shrestha, Chandani; Kang, Shinwon; Kim, Jiyeon. 2022. «MEKK-3 Acts Cooperatively with NSY-1 in SKN-1-Dependent Manner against Oxidative Stress and Aging in *Caenorhabditis elegans*». *Biology* 11(10): 1-11.
- Ignat, Ioana; Volf, Irina; Popa, Valentin. 2011. «A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables». *Food Chemistry* 126: 1821-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- INEN. 2016. «Norma Técnica Ecuatoriana Frutas Frescas.» *NTE INEN 2427*: 1-12. http://181.112.149.204/buzon/normas/ nte_inen_2427-1.pdf (accessed (15 de mayo de 2023)).
- Inoue, Hideki et al. 2005. «The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response». *Gene* 19: 2278-83.

- Jaganath, Indu B; Crozier, Alan. 2010. «Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds». En *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, eds. John Wiley y Sons Hoboken. USA, 1-48.
- Jara-Palacios, M. Jose et al. 2013. «Study of Zalema grape pomace: Phenolic composition and biological effects in *Caenorhabditis elegans*». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(21): 5114-21.
- Jayarathne, Shasika et al. 2020. «Tart cherry increases lifespan in *Caenorhabditis elegans* by altering metabolic signaling pathways». *Nutrients* 12(5): 1-15.
- Jimenez-Garcia, Sandra Neli et al. 2013. «Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics». *Food Research International* 54: 1195-1207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.004>.
- Jorgensen, Erik; Mango, Susan. 2002. «The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*». *Nature Reviews Genetics* 3: 356-69.
- Kahn, Nate et al. 2008. «Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*». *Biochemical Journal* 409: 205-13.
- Kaletta, Titus; Hengartner, Michael O. 2006. «Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism». *Nature Reviews Drug Discovery*: 387-99.
- Kalt, Wilhelmina et al. 2017. «Human anthocyanin bioavailability: effect of intake duration and dosing». *Food and Function* 8(12): 4563-69.
- Kampkötter, Andreas; Gombitang Nkwonkam, Christiane; Zurawski, Ruben Felix; Timpel, Claudia; Chovolou, Yvonne; Wätjen, Wim; Kahl, Regine. 2007. «Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*». *Archives of Toxicology* 81: 849-58.
- Kampkötter, Andreas et al. 2007. «Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*». *Toxicology* 234: 113-23.

- Kampkötter, Andreas et al. 2008. «Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin». *Comparative Biochemistry and Physiology* 149: 314-23.
- Kaushal, Niharika; Singh, Minni; Sangwan, Rajender. 2022. «Flavonoids: Food associations, therapeutic mechanisms, metabolism and nanoformulations». *Food Research International* 157: 1-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111442>.
- Kawabata, Kyuichi; Sugiyama, Yuta; Sakano, Taiken; Ohigashi, Hajime. 2013. «Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by bifidobacterium adolescentis: Prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin». *BioFactors* 39(4): 422-29.
- Kay, Robert J; Boissy, Robert J; Russnak, Roland H; Candido, E. Peter. 1986. «Efficient Transcription of a *Caenorhabditis elegans* Heat Shock Gene Pair in Mouse Fibroblasts is Dependent on Multiple Promoter Elements Which can Function Bidirectionally ». *Molecular and Cellular Biology* 6(9): 3134-43.
- Kensler, Thomas; Wakabayashi, Nobunao; Biswal, Shyam. 2007. «Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 89-116.
- Kenyon, C. 1988. «The nematode *Caenorhabditis elegans*». *Science* 240(4858): 1448-53.
- Kenyon, Cynthia et al. 1993. «A *C.elegans* mutant that twice as long as wild type». *Nature* 366: 461-64.
- Kenyon, Cynthia J. 2010. «The genetics of ageing». *Nature* 464(7288): 504-12.
- Kern, Andreas et al. 2010. «HSF1-controlled and age-associated chaperone capacity in neurons and muscle cells of *C. elegans*». *PLoS ONE* 5(1).
- Kim, Dennis; Ewbank, Jonathan. 2018. «Signaling in the innate immune response». *WormBook*: 1-35.

- Kim, Young Jun; Shin, Youngjae. 2015. «Antioxidant profile, antioxidant activity, and physicochemical characteristics of strawberries from different cultivars and harvest locations». *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58(4): 587-95.
- Kimura, Koutarou; Tissenbaum, Heidi; Liu, Yanxia; Ruvkun, Gary. 1997. «Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*». *Science* 277: 942-46.
- Koch, Karoline; Havermann, Susannah; Büchter, Christian; Wätjen, Wim. 2014a. «*Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing». *The Scientific World Journal*.
- Koch, Karoline et al. 2014b. «*Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing». *Scientific World Journal* 2014: 1-15.
- Koponen, Jani M; Happonen, Anu M; Mattila, Pirjo H; Törrönen, Riitta. 2007. «Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4): 1612-19.
- Kourtis, Nikos; Tavernarakis, Nektarios. 2011. «Cellular stress response pathways and ageing: Intricate molecular relationships». *EMBO Journal* 30(13): 2520-31. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.162>.
- Kramer, James. 2018. «Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*». *FASEB Journal* 8(5): 329-36.
- Kroon, Paul et al. 2004. «How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?» *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 15-21.
- Kubota, Michiyo et al. 2012. «Anthocyanins from the fruits of *Rubus croceacanthus* and *Rubus sieboldii*, wild berry plants from Okinawa, Japan». *Journal of Food Composition and Analysis* 28(2): 179-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2012.09.002>.
- Kühnau, Joachim. 1976. «The flavonoids. A class of semi-essential food

- components: their role in human nutrition». *World Review of Nutrition and Dietetics* 24: 117-91.
- Kuhnle, Gunter G.C. 2018. «Nutrition epidemiology of flavan-3-ols: The known unknowns». *Molecular Aspects of Medicine* 61: 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.10.003>.
- Lavefve, Laura; Howard, Luke; Carbonero, Franck. 2020. «Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health». *Food and Function* 11: 1-21.
- Lehtinen, Maria et al. 2006. «A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span». *Cell* 125: 987-1001.
- Leopoldini, Monica; Russo, Nino; Toscano, Marirosa. 2011. «The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants». *Food Chemistry* 125(2): 288-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>.
- Leung, David. 2015. «Relationship Between Changes in Contents of Nitric Oxide and Amino Acids Particularly Proline in Plants Under Abiotic Stress». *Springer*: 1-370.
- Lewis, James A; Flemingt, John T. 1995. «Basic Culture Methods». *California: Academic Press* 48: 4-27.
- Li, Jian; Labbadia, Johnathan; Morimoto, Richard I. 2018. «Rethinking HSF1 in stress, development and organismal health- zle wprowadzony do systemu». *Physiology & behavior* 176(1): 139-48.
- Li, Zhe; Ahammed, Golam Jalal. 2023. «Plant stress response and adaptation via anthocyanins: A review». *Plant Stress* 10: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100230>.
- Lila, Mary Ann; Burton-Freeman, Britt; Grace, Mary; Kalt, Wilhelmina. 2016. «Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health». *Annual Review of Food Science and Technology* 7: 375-93.

- Lin, Hui Hsuan; Chen, Jing Hsien; Huang, Chi Chou; Wang, Chau Jong. 2007. «Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation». *International Journal of Cancer* 120: 2306-16.
- Livak, Kenneth; Schmittgen, Thomas. 2001. «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method». *Methods* 25: 402-8.
- Lluisaca-Contreras, Susana A. et al. 2022. «Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): An Underutilized Superplant from the Andes». *Horticulturae* 8(5).
- López-Alarcón, Camilo; Denicola, Ana. 2013. «Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays». *Analytica Chimica Acta* 763: 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.
- Lopez-Corona, Alejandra Vanessa et al. 2022. «Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review». *Antioxidants* 11(6): 1-20.
- Losada-Barreiro, Sonia; Bravo-Díaz, Carlos. 2017. «Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases». *European Journal of Medicinal Chemistry* 133: 379-402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.061>.
- Louis Lapierre; Hansen, Malene. 2008. «Lessons from *C. elegans*: Signaling pathways for longevity Louis». *National Public Access* 23(12): 637-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- Lü, Jian Ming; Lin, Peter; Yao, Qizhi; Chen, Changyi. 2010. «Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14(4): 840-60.
- Ludwig, Iziar et al. 2015. «New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins». *Free Radical Biology and Medicine* 89: 758-

69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.400>.
- Luís, Ângelo; Duarte, Ana Paula; Pereira, Luísa; Domingues, Fernanda. 2018. «Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties». *European Food Research and Technology* 244(1): 175-85.
- Mahmoudi, Souhila et al. 2016. «Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties». *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(3): 239-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.010>.
- Di Majo, Danila et al. 2005. «Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships». *Food Research International* 38(10): 1161-66.
- Makris, Dimitris P; Rossiter, John T. 2001. «Comparison of quercetin and a non-ortho-hydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(7): 3370-77.
- Manach, Claudine et al. 2004a. «Polyphenols: Food sources and bioavailability». *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-47.
- Manach, Claudine et al. 2004b. «Polyphenols: Food sources and bioavailability». *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-47.
- Marín, Laura; Miguélez, Elisa; Villar, Claudio; Lombó, Felipe. 2014. «Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties». *BioMed Research International* 2015: 1-19.
- McGhie, Tony et al. 2003. «Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4539-48.
- McGhie, Tony K. et al. 2003. «Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16): 4539-48.

- Meneely, Philip; Dahlberg, Caroline; Rose, Jacqueline. 2019. «Working with Worms : Caenorhabditis elegans as a Model Organism». *Wiley Online Library* 19: 1-35.
- Mertz, Christian; Cheynier, Veronique; Günata, Ziya; Brat, Pierre. 2007. «Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (Rubus glaucus and Rubus adenotrichus) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21): 8616-24.
- Mikulic-Petkovsek, Maja; Slatnar, Ana; Stampar, Franci; Veberic, Robert. 2012. «HPLC-MS n identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species». *Food Chemistry* 135: 2138-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.115>.
- Milbury, Paul; Vita, Joseph; Blumberg, Jeffrey. 2010. «Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice». *Journal of Nutrition*: 1099-1104. <https://doi.org/10.3945/jn.109.117168>.
- Mira, Lurdes et al. 2002. «Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity». *Free Radical Research* 36(11): 1199-1208.
- Monge-Sevilla, Raúl et al. 2024. «Chemical composition and antioxidant properties of native Ecuadorian fruits: Rubus glabratus Kunth , Vaccinium floribundum Kunth , and Opuntia soederstromiana Diego Bola n». *Heliyon* 10: 1-14.
- Moreno-Medina, Brigitte; Casierra-Posada, Liliana; Medina-Vargas, Oscar Julio. 2023. «Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Blackberry Fruits (Rubus spp) Grown in Colombia». *Erwerbs-Obstbau* 65(4): 1047-56.
- Moretti, C. L; Mattos, L. M; Calbo, A. G; Sargent, S. A. 2010. «Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review». *Food Research International* 43(7): 1824-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.013>.

- Morimoto, Richard I. 2011. «The heat shock response: Systems biology of proteotoxic stress in aging and disease». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76: 91-99.
- Morley, James F; Morimoto, Richard I. 2004. «Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones». *Molecular Biology of the Cell* 15: 657-64.
- Motta, Maria Carla et al. 2004. «Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors». *Cell* 116: 551-63.
- Mueller, Dolores et al. 2017. «Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries». *Food Chemistry* 231: 275-86.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.130>.
- Mullis, K. et al. 1982. «Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986.» *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 24: 263-73.
- Muñoz, Manuel. 2003. «Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*». *Mechanisms of Ageing and Development* 124: 43-48.
www.elsevier.com/locate/mechagedev.
- Murota, Kaeko; Nakamura, Yoshimasa; Uehara, Mariko. 2018. «Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota». *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 82(4): 600-610.
<http://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>.
- Murphy, Coleen T; Hu, Patrick J. 2013. «Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*». *WormBook : the online review of C. elegans biology*. 1-43.
- Murphy, Coleen T et al. 2003. «Genes that act downstream of DAF-16 to influence *C. elegans* lifespan.» *Nature* 424: 277–283.
www.nature.com/nature.

- Muscolo, Adele; Mariateresa, Oliva; Giulio, Torello; Mariateresa, Russo. 2024. «Oxidative Stress: The Role of Antioxidant Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Diseases». *International Journal of Molecular Sciences* 25(6): 1-22.
- Nas, John Sylvester; Medina, Paul Mark. 2023. «Cyanidin-3-Glucoside Promotes Longevity and Tolerance Against Uva and Oxidative Stress in *Caenorhabditis Elegans*». *Exploratory Animal and Medical Research* 13(1): 105-10.
- Navarro-Hortal, María D. et al. 2022. «Strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Romina) methanolic extract attenuates Alzheimer's beta amyloid production and oxidative stress by SKN-1/NRF and DAF-16/FOXO mediated mechanisms in *C. elegans*». *Food Chemistry* 372: 1-12.
- Nebert, Daniel W; Vasiliou, Vasilis. 2004. «Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family.» *Human genomics* 1(6): 460-64.
- Nelson, F Kenneth; Riddle, Donald. 1984. «Functional Study of the *Caenorhabditis elegans* Secretory- Excretory System Using Laser Microsurgery». *The Journal of Experimental Zoology* 56: 45-56.
- Németh, Kitti et al. 2003. «Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans». *European Journal of Nutrition* 42: 29-42.
- Neves, Dina et al. 2022. «Berry anthocyanin-based films in smart food packaging: A mini-review». *Food Hydrocolloids* 133: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107885>.
- Nguyen, Truyen; Nioi, Paul; Pickett, Cecil. 2009. «The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress». *Journal of Biological Chemistry* 284: 13291-95.
- Nigon, Victor Marc; Félix, Marie-Anne. 2013. «History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms». *WormBook*: 1-22. www.wormbook.org.

- Nilova, L. P; Malyutenkova, S. M; Kruchina-Bogdanov, I. V; Shmakova, L. N. 2021. «Composition of biologically active substances of Vaccinium berries growing in the northwestern region of Russia». *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 640(2): 1-8.
- O'Reilly, Linda et al. 2013. «C. elegans in high-throughput drug discovery». *Adv Drug Deliv Rev* 309: 247-53.
- Ogg, Scott et al. 1997. «The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans». *Nature* 389(30): 994-99.
- Oh, Ji Soo et al. 2017. «Association of dietary flavonoid intake with prevalence of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors in Korean women aged ≥ 30 years». *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 63: 51-58.
- Oh, Seung Wook et al. 2005a. «JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(12): 4494-99.
- Oikonomou, Grigorios; Shaham, Shai. 2011. «The Glia of Caenorhabditis elegans». *Glia* 59: 1253-63.
- de Oliveira, Juliane Barreto et al. 2019. «Climate effects on physicochemical composition of Syrah grapes at low and high altitude sites from tropical grown regions of Brazil». *Food Research International* 121: 870-79. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.011>.
- Ortiz, Jacqueline. 2010. «Colour, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of Andean blackberry (Rubus glaucus Benth.) wines». *Agric. Food Chem* 60(60): 7463-73.

- Ortiz, Jacqueline et al. 2013. «Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador». *Journal of Food Science* 78(7): 985-93.
- Pandey, Swapnil et al. 2018. «Antioxidant and anti-aging potential of Juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil in *Caenorhabditis elegans* model system». *Industrial Crops and Products* 120: 113-22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.066>.
- Pantelidis, G. E; Vasilakakis, M; Manganaris, G. A; Diamantidis, Gr. 2007. «Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries». *Food Chemistry* 102: 777-83.
- Pap, Nora et al. 2021. «Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects». *Current Opinion in Food Science* 42: 167-86.
- Papanov, S. I. et al. 2019. «Analysis of the changes in the main characteristics and antioxidant properties in raspberries of "Rubin" variety depending on the altitude». *Bulgarian Chemical Communications* 51(3): 428-32.
- Park, Chang Jin; Seo, Young Su. 2015. «Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity». *Plant Pathology Journal* 31(4): 323-33.
- De Pascual-Teresa, Sonia; Moreno, Diego; García-Viguera, Cristina. 2010. «Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence». *International Journal of Molecular Sciences* 11(4): 1679-1703.
- Passamonti, Sabina et al. 2009. «Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their Membrane Transport and the Function of Bilitranslocase in Animal and Plant Organisms». *Current Drug Metabolism* 10(4): 369-94.

- Peirotén, Ángela; Bravo, Daniel; Landete, José M. 2020. «Bacterial metabolism as responsible of beneficial effects of phytoestrogens on human health». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(11): 1922-37. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1622505>.
- Peixoto, Herbenya et al. 2016. «Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*». *Journal of Functional Foods* 26: 385-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.012>.
- Pérez, Viviana et al. 2009. «Is the Oxidative Stress Theory of Aging Dead?» *Biochim Biophys Acta* 10: 105-1014.
- Pfenninger, Anja; Karas, Michael; Finke, Berndt; Stahl, Bernd. 2002. «Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSn (Part 1: Methodology)». *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13(11): 1331-40.
- Pietsch, Kerstin et al. 2009. «Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43». *Biogerontology* 10: 565-78.
- Pietsch, Kerstin et al. 2011. «Hormetins, antioxidants and prooxidants: Defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*». *Biogerontology* 12(4): 329-47.
- Pietta, Pier Giorgio. 2000. «Flavonoids as antioxidants». *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-42.
- Pinheiro, Aruanã et al. 2019. «Galloyl-hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-glucose isolated from *Punica granatum* L. leaves protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in BALB/c mice». *Frontiers in Immunology* 10: 1-12.
- Pires, Tânia et al. 2020. «*Vaccinium myrtillus* L. Fruits as a Novel Source of Phenolic Compounds with Health Benefits and Industrial Applications - A Review». *Current Pharmaceutical Design* 26(16): 1917-28.

- Ponder, Alicja; Hallmann, Ewelina. 2019. «Phenolics and carotenoid contents in the leaves of different organic and conventional raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars and their in vitro activity». *Antioxidants* 8(10): 1-12.
- Potì, Francesco et al. 2019. «Polyphenol health effects on cardiovascular and neurodegenerative disorders: A review and meta-analysis». *International Journal of Molecular Sciences* 20(351): 1-26.
- Prior, Ronald; Wu, Xianli; Schaich, Karen. 2005. «Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Pujol, Nathalie et al. 2001. «A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*». *Current Biology* 11: 809-21.
- Punia Bangar, Sneha et al. 2023. «Luteolin: A flavone with myriads of bioactivities and food applications». *Food Bioscience* 52: 1-14.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102366>.
- Quiñones, Miguel; Aleixandre, A. 2012. «Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular.» *Nutricion Hospitalaria* 27(1): 76-89.
- Re, Roberta et al. 1999. «Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationn decolorization assay». *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-37.
- Rechner, Andreas et al. 2002. «The Metabolism of Dietary Polyphenols and the Relevance to Circulating Levels of Conjugated Metabolites». *Free Radical Research* 36(11): 1209-18.
- Requena, T. et al. 2010a. «Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota». *Trends in Food Science and Technology* 21: 332-44.
- Requena, T. et al. 2010b. «Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota». *Trends in Food Science and Technology* 21(7): 332-44.

- Rice-Evans, Catherine; Miller, Nicholas J; Paganga, George. 1996. «Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids». *Free Radical Biology and Medicine* 20(7): 933-56.
- Riddle, Donald L; Blumenthal, Thomas; Meyer, Barbara J; Priess, James R. 1997. Cold Spring Harbor Laboratory Press *C. elegans II*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rieger, Gudrun, Maria Müller, Helmut Guttenberger, y Franz Bucar. 2008. «Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(19): 9080-86.
- Riihinen, Kaisu; Jaakola, Laura; Kärenlampi, Sirpa; Hohtola, Anja. 2008. «Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and "northblue" blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*)». *Food Chemistry* 110(1): 156-60.
- Del Rio, Daniele et al. 2013. «Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases». *Antioxidants and Redox Signaling* 18(14): 1818-92.
- Rodriguez-Mateos, Ana et al. 2014. «Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update». *Archives of Toxicology* 88: 1803-53.
- Roldán, Stalin. 2012. «Caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) de la Comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la Provincia de Cotopaxi». *Escuela Politécnica Nacional*: 2-124. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/5738/1/CD-4672.pdf>.
- Romero, Concepción et al. 2004. «Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 479-84.

- Romero, Concepción; Brenes, Manuel. 2012. «Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(36): 9017-22.
- Romero, Concepción; García, Pedro; Brenes, Manuel; Garrido, Antonio. 2001. «Colour improvement in ripe olive processing by manganese cations: Industrial performance». *Journal of Food Engineering* 48(1): 75-81.
- Romo-Vaquero, María et al. 2015. «Interindividual variability in the human metabolism of ellagic acid: Contribution of Gordonibacter to urolithin production». *Journal of Functional Foods* 17: 785-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.040>.
- Romoleroux, Katya; Forero, Enrique. 1996. *Flora of Ecuador*. ed. Gunnar Harling. Botanical Institute, Goteborg University.
- Saibabu, Venkata; Fatima, Zeeshan; Ahmad Khan, Luqman; Hameed, Saif. 2015. «Therapeutic potential of dietary phenolic acids». *Advances in Pharmacological Sciences* 2015: 1-10.
- Samad, Nadira Binte et al. 2014. «In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts». *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(10): 807-15.
- Sangiovanni, Enrico et al. 2013. «Ellagitannins from Rubus Berries for the Control of Gastric Inflammation: In Vitro and In Vivo Studies». *PLoS ONE* 8(8): 1-12.
- Santamaría, Pablo Coba et al. 2012. «Ethnobotanical study of the Mortiño (*Vaccinium floribundum*) as ancestral and potentially functional meal.» *La Granja* 16(2): 5-13. <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047400002.pdf>.
- Santhakumar, Abishek B; Battino, Maurizio; Alvarez-Suarez, José M. 2018. «Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis». *Food and Chemical Toxicology* 113: 49-65.

- Santos-Buelga, Celestino et al. 2019. Advances in Food and Nutrition Research *Plant phenolics as functional food ingredients*. 1.^a ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.012>.
- Santos-Buelga, Celestino; Gonzalez-Manzano, Susana; Dueñas, Montserrat; Gonzalez-Paramas, Ana M. 2012. 864 Methods in Molecular Biology *Extraction and isolation of phenolic compounds*.
- Santos-Buelga, Celestino; González-Paramás, Ana M. 2016. «Flavonoids: Functions, Metabolism and Biotechnology». *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*: 469-96.
- Santos-Buelga, Celestino; González-Paramás, Ana M ; González-Manzano, Susana. 2023. «Phenolic Acids and Derivatives: Description, Sources, Properties, and Applications». En *Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry*, , 37-72.
- Santos-Buelga, Celestino; Gonzalez-Paramas, Ana M. 2018. «Anthocyanins». *Universidad de Salamanca, Salamanca*: 1-12.
- Santos-Buelga, Celestino; Gonzalez-Paramas, Ana M. 2014. «Strategies in the analysis of flavonoids. En Handbook of chemical and biological plant analytical methods.» En *Handbook of chemical and biological plant analytical methods*, eds. K. Hostettmann, H. Stuppner, A Marston, y S Chen. Switzerland: John Wiley & Sons, Ltd., 543-69.
- Santos-Buelga, Celestino; González-Páramas, Ana M. 2016. «Flavonoids: Functions, Metabolism and Biotechnology». En *Industrial Biotechnology of Vitamins, Pigments, and Antioxidants*, eds. Erick J. Vandamme y José Luis Revuelta. Germany, 469-96.
- Santos-Buelga, Celestino; Scalbert, Augustin. 2010. «Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 80: 1094-1117.

- Saul, Nadine et al. 2009. «Catechin induced longevity in *C. elegans*: From key regulator genes to disposable soma». *Mechanisms of Ageing and Development* 130: 477-86.
- Saul, Nadine; Pietsch, Kerstin; Menzel, Ralph, Steinberg, Christian. 2008. «Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved?» *Mechanisms of Ageing and Development* 129: 611-13.
- Sawada, Hitoshi; Inoue, Naokazu; Iwano, Megumi. 2014. «Functional Roles of spe Genes in the Male Germline During Reproduction of *Caenorhabditis elegans*». En *Sexual Reproduction in Animals and Plants*, , 199-220.
- Scerbak, Courtney et al. 2016. «Mechanosensory neuron aging: Differential trajectories with lifespan-extending alaskan berry and fungal treatments in *Caenorhabditis elegans*». *Frontiers in Aging Neuroscience* 8(173): 1-17.
- Schreckinger, Maria Elisa et al. 2010. «Antioxidant capacity and in Vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8966-76.
- Schulenburg, Hinrich; Félix, Marie. 2017. «The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*». *Genetics: WormBook* 206: 55-86.
- Schulz, Mayara et al. 2019. «Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages». *Food Research International* 122: 627-34.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.034>.
- Schulz, Mayara; Chim, Josiane Freitas. 2019. «Nutritional and bioactive value of *Rubus* berries». *Food Bioscience* 31: 1-14.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100438>.
- Schuster, Eugene et al. 2010. «DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO». *Molecular Systems Biology* 6(399): 1-6.

- Shen, Jian; Wang, Guifeng; Zuo, Jianping. 2018. «Caffeic acid inhibits HCV replication via induction of IFN α antiviral response through p62-mediated Keap1/Nrf2 signaling pathway». *Antiviral Research* 154: 166-73. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.008>.
- Shen, Peiyi; Yue, Yiren; Zheng, Jolene; Park, Yeonhwa. 2018. «Caenorhabditis elegans: A Convenient In Vivo Model for Assessing the Impact of Food Bioactive Compounds on Obesity, Aging, and Alzheimer's Disease». *Annual Review of Food Science and Technology* 9: 1-22.
- Shiba, Yuko et al. 2008. «Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: Molecular actions of aglycone and metabolites». *Chemical Research in Toxicology* 21(8): 1600-1609.
- Shih, Ping-Hsiao; Yeh, Chi-Tai; Yen, Gow-Chin. 2007. «Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9427-35.
- da Silva-Pinto, Marcia; Lajolo, Franco Maria; Genovese, Maria Inés. 2008. «Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (Fragaria x ananassa Duch.)». *Food Chemistry* 107(4): 1629-35.
- da Silva Rosa Bonadiman, Beatriz et al. 2021. «Effects of caffeic acid on oxidative balance and cancer». *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*: 291-300.
- Silva, Sara et al. 2017. «Variation of anthocyanins and other major phenolic compounds throughout the ripening of four Portuguese blueberry (Vaccinium corymbosum L) cultivars». *Natural Product Research* 31(1): 93-98. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1209668>.
- Singh, Manjinder; Kaur, Maninder; Silakari, Om. 2014. «Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry». *European Journal of Medicinal Chemistry* 84: 206-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.013>.

- Singleton, V.L; Rossi, Joseph A. 1965. «Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents». *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-58.
- Singson, Andrew. 2001. «Every Sperm Is Sacred : Fertilization in *Caenorhabditis elegans*». *Developmental Biology* 109: 101-9.
- Skrovankova, Sona et al. 2015. «Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries». *International Journal of Molecular Sciences* 16: 24673-706.
- Song, Bingbing; Zheng, Bisheng; Li, Tong; Hai, Rui Liu. 2020. «Raspberry extract ameliorates oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the SKN-1/Nrf2 pathway». *Journal of Functional Foods* 70(March): 103977. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103977>.
- Spinardi, Anna; Mignani, I; Folini, L; Beghi, R. 2009. «Quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum*) grown at two different altitudes (450 and 650 m above sea level)». *Acta Horticulturae* 810: 817-22.
- Spinardi, Anna; Cola, Gabriele; Gardana, Claudio; Mignani, Ilaria. 2019. «Variation of Anthocyanin Content and Profile Throughout Fruit Development and Ripening of Highbush Blueberry Cultivars Grown at Two Different Altitudes». *Frontiers in Pharmacology* 10: 1-14.
- Stevens, Jan F; Maier, Claudia S. 2016. «The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols». *Phytochemistry Reviews* 15(3): 425-44.
- Stintzing, Florian C; Stintzing, Angela S; Carle, Reinhold; Wrolstad, Ronald E. 2002. «A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(2): 396-99.
- Sulston, J E; Schierenberg, E; White, J; Thomson, J. 1983. «The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*». *Developmental Biology* 100: 64-119.

- Sural, Surojit; Lu, Tzu Chiao; Jung, Seung Ah; Hsu, Ao Lin. 2019. «HSB-1 inhibition and HSF-1 overexpression trigger overlapping transcriptional changes to promote longevity in *Caenorhabditis elegans*». *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9(5): 1679-92.
- Surco-Laos, Felipe et al. 2011. «Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*». *Food and Function* 2(8): 431-506.
- Surh, Young Joon; Kundu, Joydeb Kumar; Na, Hye Kyung. 2008. «Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals». *Planta Medica* 74: 1526-39.
- Szwajgier, Dominik; Borowiec, Kamila; Pustelniak, Katarzyna. 2017. «The neuroprotective effects of phenolic acids: Molecular mechanism of action». *Nutrients* 9(477): 1-21.
- Takahashi, Yuta et al. 2011. «Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16». *Cell Metabolism* 13: 505-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.017>.
- Tambara, Andréia Limana et al. 2018. «Purple pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway». *Food and Chemical Toxicology* 120: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.057>.
- Tang, Peipei; Giust, Monica. 2020. «Metal chelates of petunidin derivatives exhibit enhanced color and stability». *Foods* 9(1426): 1-15.
- Tang, Soon Yew; Halliwell, Barry. 2010. «Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394(1): 1-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.137>.

- Timmers, Michael A; Grace, Mary H; Yousef, Gad G; Lila, Mary Ann. 2017. «Inter- and intra-seasonal changes in anthocyanin accumulation and global metabolite profiling of six blueberry genotypes». *Journal of Food Composition and Analysis* 59: 105-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.019>.
- Tissenbaum, Heidi; Guarente, Leonard. 2001. «Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*». *Nature* 410: 227-30.
- Torres, María; Trujillo, Diana; Arahana, Venancio. 2010. «Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)». *Avances en Ciencias e Ingenierías* 2: 1-8.
- Tulio, Artemio Z. et al. 2008. «Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(6): 1880-88.
- Tullet, Jennifer et al. 2008. «Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*». *Cell* 132: 1025-38.
- Tullet, Jennifer et al. 2009. «Direct inhibition of the longevity promoting factor SKN-1 by Insulin-like signaling *C. elegans*». *Cell* 132(6): 1025-38.
- Tullet, Jennifer et al. 2017. «The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms». *Aging Cell* 16: 1191-94.
- Tullet, Jennifer et al. 2015. «DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future». *Biogerontology* 16(2): 221-34.
- Tupuna, Santiago; Vera, Edwin; Ruales, Jenny. 2016. «Obtención de jugo clarificado concentrado de mortiño (*Vaccinium floribundum* kunth) mediante el uso de tecnología de membranas». *Revista Politécnica* 38(1): 1-11.
- Uno, Masaharu; Nishida, Eisuke. 2016. «Lifespan-regulating genes in *c. Elegans*». *npj Aging and Mechanisms of Disease* 2(1).

- Upadhyay, Atul et al. 2013. «Significant longevity-extending effects of *Alpinia zerumbet* leaf extract on the life span of *Caenorhabditis elegans*». *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 77(2): 217-23.
- Van-Raamsdonk; Michael, Jeremy; Hekimi, Siegfried. 2010. «Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship?» *Antioxidants & Redox Signaling* 13(12): 1-44.
- Vaneková, Zuzana; Vanek, Miroslav; Škvarenina, Jaroslav; Nagy, Milan. 2020. «The influence of local habitat and microclimate on the levels of secondary metabolites in slovak bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits». *Plants* 9(4).
- Vasco et al. 2009a. «Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum* kunth)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8274-81.
- Vasco et al. 2009b. «Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum* kunth)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(18): 8274-81.
- Vasco et al. 2009c. «Phenolic compounds in rosaceae fruits from Ecuador». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(4): 1204-12.
- Vega-Polo, Pamela et al. 2020. «Characterizing the genetic diversity of the Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.) across the Ecuadorian Highlands». *PLoS ONE* 15(12 December): 1-19. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0243420>.
- Van de Velde, Franco et al. 2016. «Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina». *Journal of Food Composition and Analysis* 47: 82-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.01.008>.
- Vendrame, Stefano et al. 2024. «In Vitro and In Vivo Evaluation of Bioactive Compounds from Berries for Wound Healing». *Current Developments in Nutrition* 8(2): 102078. <https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2024.102078>.

- Viña, Jose. 2019. «The free radical theory of frailty: Mechanisms and opportunities for interventions to promote successful aging». *Free Radical Biology and Medicine* 134: 690-94. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.045>.
- Viskeliš, P. et al. 2009. «Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* ait.) and their press cakes». *Journal of Food Science* 74(2).
- Vitale, Marilena et al. 2017. «Polyphenol intake and cardiovascular risk factors in a population with type 2 diabetes: The TOSCA.IT study». *Clinical Nutrition* 36: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.002>.
- Vogiatzoglou, Anna et al. 2015. «Flavonoid intake in European adults (18 to 64 Years)». *PLoS ONE* 10(5): 1-22.
- Walgren, Richard; Lin, Jiann Trzuo; Kinne, Rolf; Walle, Thomas. 2000. «Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT11». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294(3): 837-43.
- Walker, Glenda; Lithgow, Gordon. 2003. «Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals.» *Aging cell* 2
- Wang, Chengjun; Zuo, Yuegang; Vinson, Joe A; Deng, Yiwei. 2012. «Absorption and excretion of cranberry-derived phenolics in humans». *Food Chemistry* 132: 1420-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.131>.
- Wang, Hsiao C; Brumaghim, Julia L. 2011. «Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention: Reactive oxygen species scavenging, enzyme regulation, and metal chelation mechanisms in *E. coli* and human cells». *ACS Symposium Series* 1083: 99-175.
- Wang, Huailing; Liu, Jie; Lic, Tong; Liu, Rui Hai. 2018. «Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*». *Food and Function* 9(10): 1-10.

- Wang, Jialuan et al. 2023. «Ellagic Acid from Hull Blackberries: Extraction, Purification, and Potential Anticancer Activity». *International Journal of Molecular Sciences* 24(20): 1-18.
- Wang, Li Jin et al. 2014. «Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity». *Food Chemistry* 160: 357-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.081>.
- Wang, Shio; Hsin-Shan, Lin. 2010. «Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 140-46.
- Wang, Tian-Yang; Li, Qing; Shun, Kai. 2018. «Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate». *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 13: 1-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.
- Wei, Chia Cheng et al. 2014. «Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *camellia tenuifolia*». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(44): 10701-7.
- White, John Graham; Southgate, Eileen; Brenner, Thomson. 1986. «The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis Elegans*». *Philos Trans R Soc Lond* 314: 1-340.
- Williamson, Gary; Clifford, Michael. 2017. «Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols». *Biochemical Pharmacology* 139: 24-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.012>.
- Williamson, Gary; Clifford, Michael. 2010. «Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity?» *British Journal of Nutrition* 104(SUPPL.3): 48-66.
- Wilson, Mark et al. 2006. «Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*». *Aging Cell* 5: 59-68.

- Wormatlas. 2024. «C. elegans: Anatomical». *Wormatlas*.
<http://www.wormatlas.org/>.
- Xue, Hongkun et al. 2023. «Research Progress on Absorption, Metabolism, and Biological Activities of Anthocyanins in Berries: A Review». *Antioxidants* 12(3): 1-22.
- Yang, Li et al. 2018. «Response of plant secondary metabolites to environmental factors». *Molecules* 23(762): 1-26.
- Yobi, Abou et al. 2020. «The complex response of free and bound amino acids to water stress during the seed setting stage in *Arabidopsis*». *Plant Journal* 102(4): 838-55.
- Yokoyama, Ken et al. 2002. «Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75». *FEBS Letters* 516: 53-57.
- Yuan, Jian Min; Sun, Canlan; Butler, Lesley. 2011. «Tea and cancer prevention: Epidemiological studies». *Pharmacological Research* 64: 123-35.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2011.03.002>.
- Zamora-Ros, Raul et al. 2013. «High concentrations of a urinary biomarker of polyphenol intake are associated with decreased mortality in older adults». *Journal of Nutrition* 143: 1445-50.
- Zarkower, David. 2005 «Somatic sex determination». *WormBook*: 1-12.
- Zeng, Qilong et al. 2020. «High Altitude Is Beneficial for Antioxidant Components and Sweetness Accumulation of Rabbiteye Blueberry». *Frontiers in Plant Science* 11(September): 1-9.
- Zhang, Jiaolong; Lu, Lulu; Zhou, Lijun. 2015. «Oleanolic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(4): 843-49.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.042>.

- Zhang, Kangzhi et al. 2024. «Petunidin-3-O-[rhamnopyranosyl-(trans-p-coumaroyl)]-5-O-(β -D-glucopyranoside), the main anthocyanin from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray, enhances the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by activating DAF-16 and improving the gut microbiota». *Food Bioscience* 61: 1-13.
- Zhang, Longze; Jie, Guoliang; Zhang, Junjing; Zhao, Baolu. 2009. «Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress». *Free Radical Biology and Medicine* 46(3): 414-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.041>.
- Zhang, Shunbin et al. 2022. «Comparative Study of Three Raspberry Cultivar (*Rubus idaeus* L.) Leaves Metabolites: Metabolome Profiling and Antioxidant Activities». *Applied Sciences (Switzerland)* 12(3): 1-16.
- Zhang, Zhi et al. 2024. «Jujubae Fructus extract prolongs lifespan and improves stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* dependent on DAF-16/SOD-3». *Scientific Reports* 14(1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64045>
- Zhao, Lulu et al. 2019. «A review on flavones targeting serine/threonine protein kinases for potential anticancer drugs». *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 27: 677-85. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.01.027>.
- Zhao, Ping et al. 2008. «Caffeoyl arbutin and related compounds from the buds of *Vaccinium dunalianum*». *Phytochemistry* 69(18): 3087-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.06.001>.
- Zhao, Xu et al. 2023. «Non-enzymatic browning of wine induced by monomeric flavan-3-ols: A review». *Food Chemistry* 425: 1-11.
- Zheng, Jie; Kallio, Heikki; Linderborg, Kaisa; Yang, Baoru. 2011. «Sugars, sugar alcohols, fruit acids, and ascorbic acid in wild Chinese sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *sinensis*) with special reference to influence of latitude and altitude». *Food Research International* 44(7): 2018-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.007>.

- Zhor, Chouari et al. 2023. «Effects of polyphenols and their metabolites on age-related diseases». *Biochemical Pharmacology* 214(June).
- Zhou, Yue et al. 2016. «Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer». *Nutrients* 8: 1-35.
- Zoratti, Laura et al. 2014. «Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits». *Frontiers in Plant Science* 5: 1-16.
- Zoratti, Laura; Jaakola, Laura; Häggman, Hely; Giongo, Lara. 2015. «Modification of sunlight radiation through colored photo-selective nets affects anthocyanin profile in *Vaccinium* spp. berries». *PLoS ONE* 10(8): 1-17.