



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DEL PESO MOLECULAR DE OLIGOSACÁRIDOS DE
PECTINA FERULADA SOBRE SU ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA EN LA LÍNEA CELULAR CACO-2**

Por:

María Zuleth Gomeztagle Romero

TESIS APROBADA POR LA

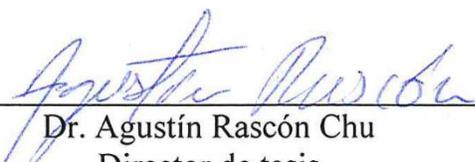
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

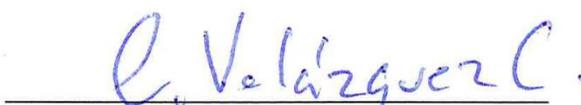
MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Zuleth Gomeztagle Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias


Dr. Agustín Rascón Chu
Director de tesis


Dra. Elizabeth Carvajal Millán
Integrante del comité de tesis


Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Integrante del comité de tesis


MC. José Alfonso Sánchez Villegas
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efecto del Peso Molecular de Oligosacáridos de Pectina Ferulada sobre su Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular Caco-2” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora María Zuleth Gomeztagle Romero, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a CONACYT por el apoyo en el financiamiento en el transcurso de la maestría.

Al CIAD por permitirme ser parte de su programa de posgrados. Y al proyecto CB-2015-01-254297 financió el desarrollo de esta tesis.

Un enorme agradecimiento a cada uno de los miembros que forma el comité de tesis por su tiempo, disposición, guía y por cada uno de los aportes durante el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Agustín Rascón, Dra. Elizabeth Carvajal, Dr. Carlos Arturo Velázquez y M.C. Alfonso Sánchez. A las personas que a lo largo del desarrollo de los distintos experimentales brindaron su apoyo y guía:

M.C. Karla Martínez del Laboratorio de biopolímeros.

M.C. Tania Carvallo Ruíz del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.

Dr. Efraín Alday y M.C. Lucila Rascón del laboratorio de inmunología de la universidad de Sonora
A mi compañero de posgrado: Dr. Federico Ohlmaier, gracias por tu apoyo en mis experimentales y por tus consejos a lo largo de la maestría.

A mi compañera y amiga Karla Félix, tu apoyo fue fundamental durante todo el transcurso de la maestría, gracias por tu compañía, tu amistad y por toda la fuerza para seguir creciendo.

A M.C Gerardo Estrada, gracias por ser mi equipo, por las porras y palabras de aliento, por siempre creer en mí, gracias por todas las aventuras y sube y bajas que compartimos que fueron parte del proceso de la maestría. Por tu gran amistad y tu gran apoyo.

Gracias enormes a mi familia, mis papas por todo su amor, su fuerza desde la distancia y por todo su apoyo. A mis hermanos, por su cariño y compañía a lo largo de esta vida. A mis tías por estar al pendiente de mi proceso y por apoyarme.

DEDICATORIA

*A mi **Mama**:*

Gracias por tu credibilidad en mi persona, por tu fuerza, por tu compañía en esta vida y por el amor y apoyo incondicional que siempre me brindas.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Pectinas.....	15
2.1.1 Estructura Química de Pectinas Feruladas.....	15
2.2. Oligosacáridos de Pectina (OP)	17
2.2.1 Métodos de Obtención de Oligosacáridos de Pectina	17
2.3. Cáncer.....	18
2.3.1. Cáncer Colorrectal (CCR).....	19
2.3.2. Tratamientos en CCR.....	20
2.3.3. Doxorrubicina.....	21
2.4. Potencial Antiproliferativo de OP.....	22
2.4.1. Potencial Antiproliferativo de OP en Relación con su Peso Molecular	24
2.4.2. Interacción de OP con Receptores Celulares en Caco2	25
2.4.2.1. Galectina-3.....	26
2.4.2.2. Caspasa-8 y Caspasa-3	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo General.....	29
4.2. Objetivos Específicos.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Materia Vegetal.....	30
5.2. Reactivos	30
5.3. Extracción de Pectina	31
5.4. Obtención de Oligosacáridos de Pectina (OP).....	32
5.5. Ultrafiltración de OP	31
5.6. Caracterización Fisicoquímica de OP	32
5.6.1. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	32
5.6.2. Contenido de Monosacáridos Neutros.....	32
5.6.3. Determinación de Ácido Galacturónico.....	33

CONTENIDO (continuación)

5.6.4. Determinación de Ácido Ferúlico.....	33
5.7. Actividad Antioxidante	34
5.7.1. Capacidad Antioxidante por DPPH.....	34
5.7.2. Ensayo de Eliminación de Radicales ABTS+.....	35
5.8. Cultivo Celular de Caco-2 y ARPE-19	36
5.8.1. Prueba de Viabilidad Celular por Ensayo de MTT	37
5.8.2. Combinación de Tratamientos fracciones de OP con Doxorubicina	38
5.8.2.1. Análisis de la combinación de tratamientos por isoblograma	38
5.9. Análisis Estadístico	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. Análisis FTIR.....	41
6.2. Composición de Monosacáridos y Ácido Galacturónico	43
6.3. Contenido de Ácido Ferúlico.....	45
6.4. Capacidad Antioxidante	46
6.5. Efecto Antiproliferativo de OP.....	48
6.5.1. Citotoxicidad Celular.....	48
6.5.2. Efecto Antiproliferativo	49
6.5.3. Sinergismo en Combinación de Doxorubicina con OP.....	52
7. CONCLUSIONES	58
8. REFERENCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Representación esquemática de la estructura propuesta para pectina.....	16
2. Estructura química de Doxorubicina.....	21
3. Representación esquemática de actividades biológicas de pectinas modificadas....	24
4. Gráfico de Isoblograma.....	40
5. FTIR de OP de las fracciones de peso molecular de >1, 1-10 y >10 kDa.....	43
6. FTIR de fracciones de pectina cítrica modificada con enzimas (EMCP-N).....	43
7. Efecto citotóxico de efecto antiproliferativo de Dox en línea celular normal ARPE-19.....	50
8. Efecto citotóxico de las fracciones de oligosacáridos de pectina sobre la línea celular ARPE19	50
9. Efecto antiproliferativo de fracciones de OP Caco2.....	51
10. Efecto en proliferación celular de Caco2 con combinación de tratamientos.....	52
11. Efecto de la combinación de tratamiento sobre proliferación celular de Caco2....	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Concentraciones de la combinación de tratamientos y su Log correspondiente.....	40
2. Composición química de pectina de remolacha azucarera.....	45
3. Comparación de composición de monosacáridos de los OP extraídos de remolacha azucarera y de fracciones de pectina cítrica modificada.....	45
4. Contenido de Ácido Ferúlico en las fracciones de OP.....	46
5. Actividad antioxidante de las fracciones de oligosacáridos de pectina.....	48
6. Relación entre concentraciones con moléculas de Dox y OP por célula.....	57

RESUMEN

La pectina es un polisacárido complejo proveniente de la pared celular de los vegetales. Su estructura química está compuesta por una cadena central de ácido galacturónico (GalpA) unido por enlaces glucosídicos α -(1,4), formando homogalacturonanos lineales (HG) intercalado con ramificaciones con unidades de ramnosa y galactosa, es decir, de ramnogalacturonanos tipo I y II (RG-I y RG-II), arabinano y arabinogalactano. Gracias a su diversidad estructural se pueden obtener cadenas cortas denominadas oligosacáridos, que presentan distintas propiedades funcionales y bioactividades. Es por lo anterior que surge el interés hacia la obtención de oligosacáridos a partir de recursos biológicos reutilizables como los residuos agroindustriales.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel del peso molecular de oligosacáridos de pectina (OP) en su actividad antiproliferativa sobre células de adenocarcinoma colorrectal de humano (Caco2). Los OP se obtuvieron a partir de la degradación parcial de la estructura de la pectina por hidrólisis química e hidrólisis hidrotérmica y posteriormente por separación de peso molecular en rangos de <1, 1-10 y >10 kDa. A dichas fracciones se les determinó el contenido de azúcares neutros por cromatografía de gases, la identidad molecular y el grado de metoxilación por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y el contenido de ácido ferúlico y ácido galacturónico por cromatografía líquida (HPLC). Para finalmente evaluar mediante (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) el efecto antiproliferativo de las fracciones de OP sobre la línea celular de cáncer colorrectal Caco2 y posible sinergismo de OP con Doxorrubicina.

Las fracciones de OP estudiadas mostraron tener un contenido de monosacáridos similares entre ellas, con un alto contenido de ácido galacturónico. La fracción de OP <1 kDa, presentó efecto antiproliferativo (inhibición crecimiento celular 20 y 70 %) sobre Caco2 en las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las otras dos fracciones de OP no presentaron efecto en inhibir el crecimiento celular de Caco2. En la evaluación de sinergismo de cada fracción de OP con Doxorrubicina, la combinación de OP de 1-10 kDa y Doxorrubicina presentan efecto aditivo (0.9), sin embargo, las combinaciones de OP <1 kDa y >10 kDa no fueron aditivas. La diversidad de los componentes estructurales de las cadenas de OP, brinda gran posibilidad de interacciones celulares una vez en contacto con la membrana celular. Además de tener un efecto antiproliferativo por sí solo, los OP

tienen también el potencial de sensibilizar células cancerígenas al estar en compañía de una droga anticancerígena.

Palabras claves: Oligosacáridos de pectina, pectina, antiproliferativo, doxorrubicina, Caco2, sinergismo.

ABSTRACT

Pectin is a complex polysaccharide from the cell wall of plants. Its chemical structure is composed of a central chain of galacturonic acid (GalpA) linked by α -(1,4) glycosidic bonds, forming linear homogalacturonans (HG) intercalated with ramifications with rhamnose and galactose units, that is, type I rhamnogalacturonans and II (RG-I and RG-II), arabinan and arabinogalactan. Thanks to its structural diversity, short chains called oligosaccharides can be obtained, which have different functional properties and bioactivities. It is for the above that interest arises in obtaining oligosaccharides from reusable biological resources such as agro-industrial waste.

The objective of this work was to determine the role of the molecular weight of pectin oligosaccharides (OP) in their antiproliferative activity on human colorectal adenocarcinoma cells (Caco2). The OPs were obtained from the degradation of the pectin structure by chemical hydrolysis and hydrothermal hydrolysis and later by molecular weight separation in ranges of <1, 1-10, and >10 kDa. The content of neutral sugars was determined in these fractions by gas chromatography, the content of functional groups by Fourier transform infrared spectroscopy, and the content of ferulic acid and galacturonic acid by liquid chromatography (HPLC). To finally evaluate by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) the antiproliferative effect of OP fractions on the Caco2 colorectal cancer cell line and possible synergism of OP with Doxorubicin.

The OP fractions studied showed similar monosaccharide content among them, with a high content of galacturonic acid. The fraction of OP <1kDa, presented an antiproliferative effect (cell growth inhibition 20 and 70 %) on Caco2 at concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$. The other two OP fractions had no effect in inhibiting Caco2 cell growth. In the synergism evaluation of each OP fraction with Doxorubicin, the combination of 1-10 kDa OP and Doxorubicin present an additive effect (0.9), however, the combinations of OP <1 kDa and >10 kDa are not additive. The diversity of the structural components of the OP chains offers a great possibility of cellular interactions once in contact with the cell membrane. In addition to having an antiproliferative effect on its own, it also has the potential to sensitize cancer cells when in the company of an anticancer drug.

Key words: Pectin oligosaccharides, pectin, antiproliferative, doxorubicin, Caco2, synergism.

1. INTRODUCCIÓN

La pared celular vegetal forma una matriz extracelular continua de célula a célula, constituyendo el esqueleto de los tejidos vegetales. Es un componente clave en la formación de paredes celulares de plantas superiores, siendo involucrada en varias propiedades como la porosidad, la carga superficial, el pH, el equilibrio iónico, la adhesión célula-célula, flexibilidad de la pared celular y defensa contra el estrés biótico (Bonnin *et al.*, 2014).

La pectina es probablemente el polisacárido más complejo y versátil presente en las paredes celulares de las plantas. Consta de diferentes monosacáridos, que están unidos mediante enlaces glucosídicos entre sí. Puede estar constituida por diferentes regiones estructurales asociadas como los homogalacturonanos (HG), xylogalacturonanos (XGA), rhamnogalacturonanos tipo I (RGI), rhamnogalacturonanos tipo II (RGII), arabinanos y arabinogalactanos (Chan *et al.*, 2017). Siendo elementos primarios estructurales las regiones HG, RG I y RG II. El HG consiste en una columna vertebral de restos de (1→4)- α -D-ácido galacturónico, que pueden ser metilesterificados en el C-6 del ácido galacturónico. La subunidad RG-I tiene repeticiones de residuos alternados de D-galacturonosil- α -1,2-1-ramnosa unidos por α -1,4 y las unidades de ramnosa, a su vez, pueden sustituirse con cadenas laterales de azúcares neutros (Li *et al.*, 2021; Remoroza *et al.*, 2014).

Es de gran interés aclarar la estructura química de las pectinas, conocer más sobre su organización y diversidad estructural, así como las dimensiones de las cadenas laterales y la naturaleza de los residuos de monosacáridos terminales que desempeñan un papel crucial sobre las propiedades biológicas y fisiológicas, que presenta la pectina (Marić *et al.*, 2018; Patova *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

Los oligosacáridos son cadenas cortas de polisacáridos conformados de 2 a 10 monosacáridos en su estructura, son indispensables como componentes en la alimentación y se utilizan en farmacéuticos, cosméticos y preparaciones nutraceuticas (Rajagopalan y Krishnan, 2019). Los oligosacáridos en el tracto digestivo promueven la producción de ácidos grasos volátiles por la microbiota colónica, que pueden reducir la constipación, reducir la glucosa en sangre, mejorar la absorción de minerales y el metabolismo de lípidos, prevenir el desarrollo de cáncer de colon, inhibir la adhesión de patógenos, y modular la actividad inmune (Tan et al., 2018). Además, los OP presenta efectos antioxidantes al reducir la actividad de radicales libres (Ogutu y Mu, 2017; Chen et al., 2019). Se ha observado el efecto inmunomodulador de los oligosacáridos sobre diferentes tipos de inmunidad, siendo que tienen un efecto sobre el sistema inmune como antiinflamatorio, por medio de regulación de vías que promueven la inflamación (Bezerra et al., 2018), mejorando la respuesta inmune de la mucosa al incrementar la fagocitosis de macrófagos y promover la variación de mediadores proinflamatorios, entre otros (Ramachandran *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2012; Kothari *et al.*, 2014).

Existe una variedad de reportes sobre las propiedades anticáncer de las fracciones de pectina cítrica modificada por calor, se ha visto su capacidad en inhibir el crecimiento celular de células de cáncer de colon e inducir citotoxicidad en células de cáncer de próstata, entre otros. Su principal efecto antiproliferativo es mediante la inducción de apoptosis, al inhibir el receptor de membrana galectina-3, siendo que este se encuentra sobre expresado en células cancerígenas que promueven su proliferación celular y metástasis (Blanchard *et al.*, 2014; Eliaz y Raz, 2019; Johnson *et al.*, 2007).

Se considera que las propiedades biológicas de oligosacáridos de pectina y pectina dependen de su composición química de monosacáridos, grado de esterificación, longitud estructural, peso molecular, ramificaciones y tipos de constituyentes entre otros. Por ello, el interés en su obtención y caracterización fisicoquímica en base a las propiedades biológicas (Gómez *et al.*, 2017).

2.1. Pectinas

Los polisacáridos de pectina son componentes estructurales vitales de las paredes celulares de las plantas, y a menudo están asociados con otros polisacáridos de la pared celular como la celulosa y las hemicelulosas. El uso tradicional de la pectina es como agente gelificante, espesante y estabilizador que se complementa con las propiedades de ser un sustituto de grasa y un ingrediente funcional que promueve la salud (Luo *et al.*, 2017; Babbar *et al.*, 2016). Las aplicaciones no alimentarias incluyen el uso en las industrias médica y farmacéutica, donde los beneficios que promueven la salud y las bioactividades de la pectina han demostrado potencial para aplicaciones biomédicas que incluyen administración de medicamentos, ingeniería de tejidos y curación de heridas (Munarin *et al.*, 2012).

Las pectinas se obtienen a partir de cítricos o pomáceos, desperdicios de mango, amaranto, remolacha azucarera, y también de la transformación de sus desechos agroindustriales, como cáscaras, bagazo y orujo de frutas, entre otros. Constantemente se buscan nuevas fuentes de pectinas debido a la creciente demanda y al creciente interés en agregar valor a fuentes alternativas para obtener pectinas con propiedades funcionales de interés (Müller-Maatsch *et al.*, 2016; Lara-Espinoza *et al.*, 2018).

2.1.1. Estructura química de Pectinas Feruladas

El término pectina cubre una variedad de polímeros de acuerdo con su peso molecular, configuración química, y contenido de azúcares neutros (Flutto, 2003; Bonnin *et al.*, 2014). Estructuralmente, las pectinas están compuestas por una cadena central de ácido galacturónico (GalpA) unido por enlaces glucosídicos α -(1,4) formando un HG que puede estar intercalado con ramificaciones RG-I y RG-II, otros elementos estructurales de los que puede estar atribuido son los XGA, arabinano y arabinogalactano. Los grupos hidroxilo del ácido galacturónico puede estar parcialmente metilado o acetilado. Las cadenas de azúcares neutros pueden estar unidas a las regiones “lisas”, generando regiones “ramificadas”. Los azúcares neutros más comunes son

ramnosa, galactosa y arabinosa. La pectina se produce comercialmente por extracción a partir de la materia prima con soluciones ácidas y precipitación adicional de alcohol (Combo *et al.*, 2013; Karaki *et al.*, 2016; Prandi *et al.*, 2018).

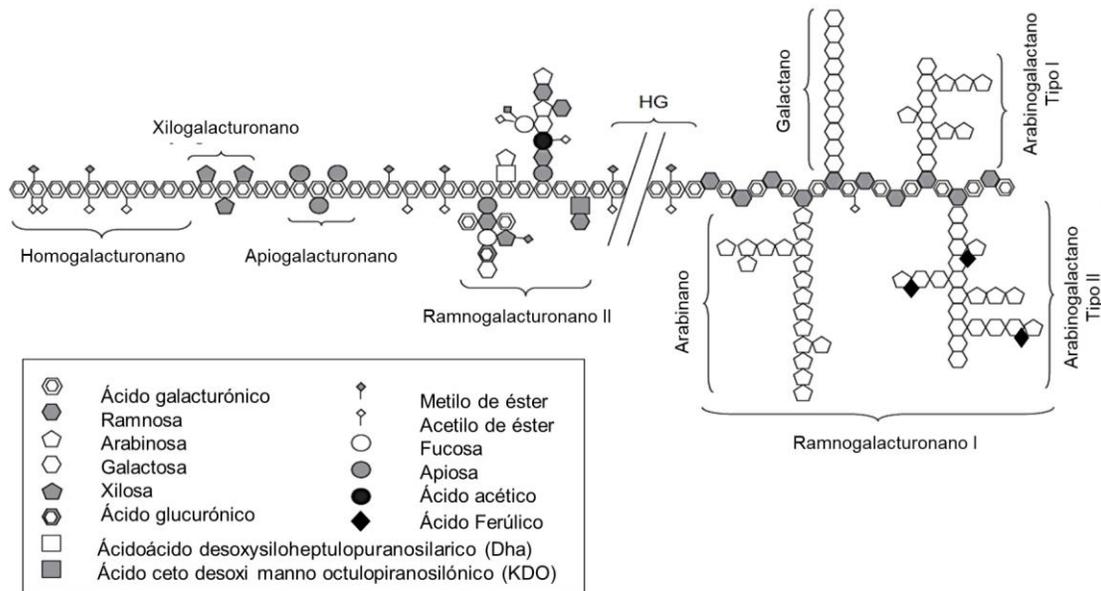


Figura 1. Representación esquemática de la estructura propuesta para pectina. Modificada a partir de B. Gullón, *et al.*, (2013), con inclusión de ácido ferúlico (AF).

En función del material vegetal de procedencia, las pectinas pueden variar en sus propiedades funcionales. De hecho, el HG de diferentes materias primas puede presentar diferencias estructurales significativas, que influyen en sus propiedades y aplicaciones. Por ejemplo, las cadenas HG en la pectina de remolacha azucarera son más cortas que las de cítricos y pomáceos, su RG-I es más abundante y puede presentar ácido ferúlico (AF) en la cadena principal de arabinano, en la arabinosa terminal, o en la columna vertebral principal de galactano. El ácido ferúlico está unido principalmente en la posición O-2 de los residuos de arabinosa α -1,5 enlazados en las cadenas laterales de arabinano y también puede encontrarse unido a galactanos β -1, 4 de la cadena central, (figura 1) (Oosterveld *et al.*, 1997; Ou y Sun, 2014). Las sustituciones de AF dentro de la pectina pueden estar presentes como monómeros o formar dímeros con otras cadenas laterales a través de reacciones de acoplamiento oxidativo (Holck *et al.*, 2011). Su contenido confiere a las pectinas una característica favorable para los efectos multifuncionales basados en la actividad

antioxidante. Las pectinas extraídas de espinaca, remolacha azucarera y quinoa son las que presentan cantidades significativas de ácido ferúlico esterificado, por lo que se les puede denominar como pectinas feruladas (Saulnier y Thibault, 1999; J. Zhu, *et al.*, 2018).

2.2. Oligosacáridos de Pectina (OP)

La estructura de los oligosacáridos de pectina (OP) está compuesta por unidades de monosacáridos unidas por enlaces glucosídico, cada molécula de oligosacárido tiene un extremo reductor y uno no reductor. El extremo reductor es cuando la molécula presenta un grupo aldehído libre capaz de actuar como agente reductor. La mayoría de los oligosacáridos se obtienen por la hidrólisis de polisacáridos hacia unidades más cortas por hidrólisis ácida o enzimática (BeMiller, 2019). La pectina es de los polisacáridos de mayor interés para la obtención de oligosacáridos con propiedades funcionales por su diversidad estructural (Prandi *et al.*, 2018).

2.2.1. Métodos de Obtención de Oligosacáridos de Pectina

El interés hacia la obtención de OP funcionales de recursos biológicos reutilizables es recuperar estructuras con mayor potencial de bioactividad (Holck *et al.*, 2014). La extracción de los oligosacáridos de pectina se puede llevar a cabo por varios métodos fisicoquímicos, donde se lleva a cabo primero, la obtención de pectina y después, la degradación de su estructura para obtener los oligosacáridos.

La obtención de oligosacáridos de pectina es a partir de la extracción convencional de la pectina que es a base de agua con la aplicación de distintos aditivos químicos, para llevar a cabo la beta-eliminación de la cadena central de HG (Li *et al.*, 2012). La extracción de pectina y OP se realiza con hidrólisis ácida con valores de pH de 1.5-3.0 y temperaturas altas de 60-100 °C, por algunas horas dependiendo del método específico (Putnik *et al.*, 2017). Se ha implementado, el tratamiento hidrotérmico de pectina para producir la degradación y desramificación de la estructura química,

este método se realiza a temperaturas de 130-230 °C y en algunos casos con presión mediante autoclave (de Moura *et al.*, 2015). Un método muy utilizado para la obtención de OP es la hidrólisis enzimática, el cual implica el uso de enzimas específicas con alta selección en regiones del polisacárido, dependiendo de su sitio de acción en el polímero péptico, las enzimas que degradan la pectina se pueden clasificar como degradadoras de HG y degradadoras de RG-I, a su vez, la estructura puede sufrir dos tipos de degradación: desesterificación y despolimerización. Además de afectar la masa molar global, las modificaciones estructurales pueden afectar los sustituyentes no azucarados o las cadenas laterales de azúcares (Concha y Zúñiga, 2012; Karaki *et al.*, 2016).

Una vez obtenidos los OP, deben ser purificados para eliminar compuestos no deseados que pudieron formarse durante la extracción. Se han propuesto varias técnicas, que incluyen extracción de etanol y solventes orgánicos, evaporación al vacío, precipitación de solventes, liofilización, separación cromatográfica, adsorción, intercambio iónico o tecnologías de membrana, entre otras (Dranca y Oroian, 2018).

Posteriormente, es posible emplear métodos de caracterización fisicoquímica para conocer la estructura química, peso molecular, grado de esterificación, acetilación y polimerización. Esto requiere de la combinación de varias técnicas analíticas, como la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector de masas (HPLC-MS), cromatografía de intercambio iónico (HPAEC), métodos de ionización por electro pulverización y desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI), espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) (Sabater *et al.*, 2019).

La identificación y caracterización fisicoquímica de los oligosacáridos de pectina es la base para comprender como sus distintos componentes pudieran interactuar a nivel biológico y así guiar hacia posibles rutas o mecanismos de acción relacionados a sus efectos benéficos en la salud.

2.3. Cáncer

El cáncer pertenece al grupo de enfermedades complejas y devastadoras que implican un crecimiento celular incontrolado con el potencial de invadir o afectar cualquier parte del cuerpo. A nivel mundial, el cáncer es una enfermedad que va en aumento y es considerada como una de las

principales causas de muerte, su incidencia y mortalidad va en un acelerado aumento, siendo que, en 2018, se estimó que la carga del cáncer ascendió a 18 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes, una de las razones de esto lo anterior es el envejecimiento y el crecimiento poblacional, además de los factores de riesgo del cáncer (Bray *et al.*, 2018). En México, la magnitud de los efectos del cáncer en la salud no es muy diferente al panorama mundial, siendo la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Anualmente en el país se suman más de 128,000 casos de cáncer en mexicanos. De acuerdo con organismos internacionales, los cánceres de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más recurrentes en la población en general para ambos sexos. En un análisis epidemiológico encontraron que en los estados del norte del país se registró un incremento en la mortalidad por cáncer. La Sociedad Mexicana de Oncología (SMeO) considera que las cifras elevadas de muertes por cáncer se deben a diagnósticos tardíos, donde el 60 % de los casos de cáncer en México es detectado en etapas avanzadas (Sociedad Mexicana de Oncología A.C, 2016).

2.3.1. Cáncer Colorrectal (CCR)

El CCR es causado por factores externos como el tabaco, alcoholismo, obesidad, sedentarismo y dietas altas en carnes rojas y procesada. Como factores de riesgo interno son los antecedentes familiares de cáncer colorrectal y algunas enfermedades hereditarias (Instituto Nacional de Cancerología & Instituto Nacional de Salud Pública, 2015).

En México el CCR representa una de las principales causas de muerte, siendo de las patologías más frecuentes en la población general, con un aumento en su frecuencia. En general se reporta en pacientes de arriba de 50 años, pero se ha notado un aumento de este padecimiento en población mexicana más joven. El tratamiento de CCR, consiste principalmente en cirugía, quimioterapia como adyuvante y terapias dirigidas. Sin embargo, estas presentan un bajo pronóstico de supervivencia debido al diagnóstico tardío y a su sintomatología tardía de la enfermedad, además de que los tratamientos son agresivos y presentan efectos secundarios nocivos para la salud (Tirado y Mohar, 2008; Burbano *et al.*, 2016).

Se ha visto que la dieta juega un factor importante en el desarrollo del cáncer, ya que el contenido

de esta puede ayudar a prevenir e influir en la evolución de este, esto cuando está compuesta por un consumo apropiado de frutas y verduras, por su alto contenido de fibra, nutrientes, vitaminas y minerales. La fibra de los vegetales está formada por cadenas biopoliméricas de polisacáridos, que le confieren protección y estructura, entre ellos la pectina, como se ha mencionado anteriormente (Stepien *et al.*, 2016).

La resistencia a drogas en las células tumorales complica la eliminación de éstas, además la aplicación de quimioterapias presenta una gran cantidad de efectos secundarios en el organismo. Estudios sobre la pectina y sus derivados, han podido establecer un rol de los anteriores sobre la inhibición a metástasis. Principalmente estas propiedades están asociadas a la pectina proveniente de la dieta, con efecto en la inhibición de crecimiento tumoral y regulación de oncogénesis (Jeon *et al.*, 2011; Naqash *et al.*, 2017).

2.3.2. Tratamientos en CCR

El tratamiento para CCR depende del estadio de la enfermedad, a partir del diagnóstico y confirmación de CCR mediante las pruebas de colonoscopia, sangre en heces, hemograma, tomografía, pruebas de laboratorio, signos y síntomas. Estos permiten la clasificación de las etapas de CCR I, II III y IV (Argilés *et al.*, 2020). De acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer, en los estadios I, II, donde el cáncer se encuentra localizado se emplea la resección del tejido cancerígeno por cirugía, y posteriormente tratamientos locales; en el estadio III, el cáncer está localizado en colon y presenta diseminación a ganglios linfáticos cercanos o a un solo tejido del cuerpo, como tratamiento en esta etapa además de la cirugía se pueden emplear tratamientos sistémicos como la quimioterapia; en el estadios IV, hay metástasis en otros tejidos cercanos o lejanos y ganglios, en estas etapas se evalúa la viabilidad de la cirugía y se escoge tratamientos de quimioterapia. Como parte de los medicamentos para tratar el cáncer colorrectal se emplea 5-fluorouracilo (5-FU), Capecitabina, Irinotecán, Oxaliplatino como los más comunes, dependiendo del estado del paciente estos se pueden emplear en combinación (ACS, 2020; Arnold *et al.*, 2017).

2.3.3. Doxorubicina

Doxorrubicina (Dox), es una droga antineoplásica perteneciente a la clase de antraciclinas, utilizada para tumores sólidos, cánceres de sangre, y neoplasias diseminadas, a su vez, también tiene uso como adyuvante terapéutico (Peres Diaz *et al.*, 2020). La estructura química de Dox se muestra en la Figura 2, la molécula de Dox puede formar fuertes enlaces de hidrógeno con otros radicales hidroxilo o grupos amino, lo que relaciona la liberación de Dox activada por el pH en el medio (Ruoshi *et al.*, 2021).

Doxorrubicina ingresa a las células mediante difusión celular y por captación mediada por portadores, esto dependiendo del ambiente extracelular que se ve afectado por la temperatura y pH. Dentro de la célula su principal acción y distribución es sobre el material genético en el núcleo, por su interacción con la enzima Topoisomerasa II, inhibiendo su actividad de intercalarse con el ADN, esto resulta en el desdoblamiento de la hebra de ADN ocasionando la generación de nucleosomas inestables, resultando en la inducción de apoptosis y autofagia (Sritharan y Sivalingan, 2021).

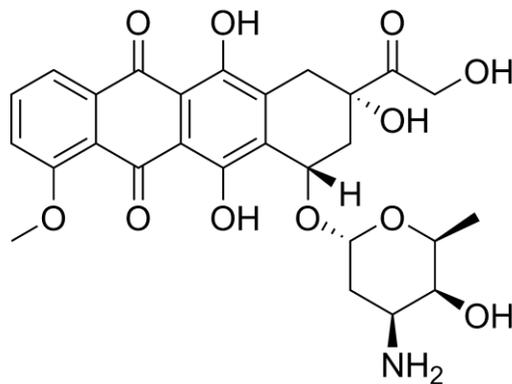


Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de Doxorubicina.

Intracelularmente doxorubicina se une específicamente a la membrana de fosfolípidos interna mitocondrial e inhibe el complejo I y II de la cadena de transporte de electrones, favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), en el citoplasma la estructura química de doxorubicina sufre una reducción de un electrón a un radical libre, una

especie de semiquinona catalizada por microsomas, sarcosomas y mitocondrias. En presencia de oxígeno molecular, los radicales de semiquinona de doxorubicina se reoxidan rápidamente en un proceso que genera superóxido (Davies y Doroshow, 1986; Thorn *et al.*, 2011).

El uso de doxorubicina está limitado por una toxicidad cardíaca única que puede ser el resultado de la formación de radicales libres inducida por la antraciclina. Los efectos secundarios del uso de Dox como tratamiento se pueden presentar a partir de la primera administración, donde puede haber disfunción cardíaca, arritmias, cardiomiopatías, además de vómitos, náusea, problemas gastrointestinales, y en algunos casos en el sistema neurológico (Tacar *et al.*, 2013). Adicionalmente, se han buscado variaciones en la formulación de Dox, tratamientos combinados o adyuvantes para disminuir la toxicidad de Dox. También hay un interés en administrar un tratamiento previo a Dox para proteger o prevenir los efectos secundarios (Varela-López *et al.*, 2019).

La mayoría de los agentes anticancerígenos no pueden diferenciar específicamente el tejido cancerígeno de las células normales, lo que lleva a una toxicidad sistémica con efectos secundarios muy nocivos. Los efectos secundarios graves en otros tejidos limitan en gran medida la dosis sistémica máxima permitida, lo que resulta en concentraciones inadecuadas del fármaco que llegan al tumor. La administración de fármacos convencional no dirigida sigue siendo un impulso importante para el régimen de tratamiento tradicional porque reduce gradualmente los efectos secundarios al tiempo que extiende la biodisponibilidad de los fármacos antineoplásicos quimioterapéuticos. Sin embargo, esta modalidad no ha dado el resultado esperado (Banerjee *et al.*, 2017).

2.4. Potencial Antiproliferativo de OP

A pesar de la disponibilidad de muchos medicamentos contra el cáncer, el perfil de la enfermedad por patogenicidad evidenció de manera convincente que la mortalidad de los pacientes afectados se debe a la diseminación metastásica. El cáncer gástrico está estrechamente relacionado con factores dietéticos y alteraciones en el estado oxidante/antioxidante, aumento de la proliferación celular, angiogénesis y desregulación de la apoptosis. La pectina dietética es fermentada en el colon

a cadenas cortas de ácidos grasos que normalizan la microbiota del tracto gastrointestinal disminuyendo el pH y previniendo desarrollo patogénico, afectando la red de galectina, regulando proteínas apoptóticas en el colon (Gómez *et al.*, 2014; Louis *et al.*, 2014).

Se ha reportado que los oligosacáridos o fracciones de pectina (OP) ricas en regiones estructurales de HG y RGI presentan actividad antiproliferativa en células cancerígenas al inducir la apoptosis, siendo que las cadenas laterales de galactano están relacionadas con la actividad y las de arabinano en proporcionar un efecto aditivo leve, la combinación de estas regiones se ha relacionado con un efecto antiproliferativo potenciado, siendo que esta adopta una conformación cooperativa que maximiza la disponibilidad de cadenas laterales de galactanos (Suganya *et al.*, 2016; Naqash *et al.*, 2017)

En este sentido se ha visto que los OP pueden participar en la inhibición de la función de la proteína pro-metastásica galectina-3 (Gal3), esto a través de una interacción con las cadenas laterales de galactanos, bloqueando su interacción con otras proteínas y péptidos, deteniendo todas las vías posibles que implican adhesión celular, migración, y apoptosis (Jackson *et al.*, 2007; Newlaczył y Yu, 2011). Por lo anterior se postuló como un mecanismo de acción potencial y a su vez da lugar a la teoría de que las regiones RGI de pectina, particularmente las cadenas laterales de galactanos, son importantes para la bioactividad (Gao *et al.*, 2013; Maxwell *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, las pectinas modificadas con químicos, calor, radiación y/o enzimas, teniendo como resultado oligosacáridos poseen una mayor actividad antitumoral que las pectinas nativas o no modificadas (Vladislav *et al.*, 2009). A su vez, se ha sugerido que los oligosacáridos de bajo peso molecular muestran una mejor propiedad inhibidora de la galectina-3 en comparación con la pectina (Kapoor y Dharmesh, 2017).

Por otro lado, la pectina cítrica modificada (PCM) por calor utilizada comercialmente, tiene efecto inmunomodulador, activando células T citotóxicas y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), esto sobre una línea celular de leucemia mieloide crónica promoviendo la citólisis en estas, esta activación fue de manera dosis dependiente de PCM (Ramachandran *et al.*, 2011).

La estructura de los oligosacáridos de pectina y pectinas modificadas pueden variar dependiendo del tratamiento empleado para su extracción y obtención. Por esto, se han encontrado diferentes mecanismos antiproliferativos en relación con el proceso de modificación o hidrólisis, como lo muestra la Figura 3.

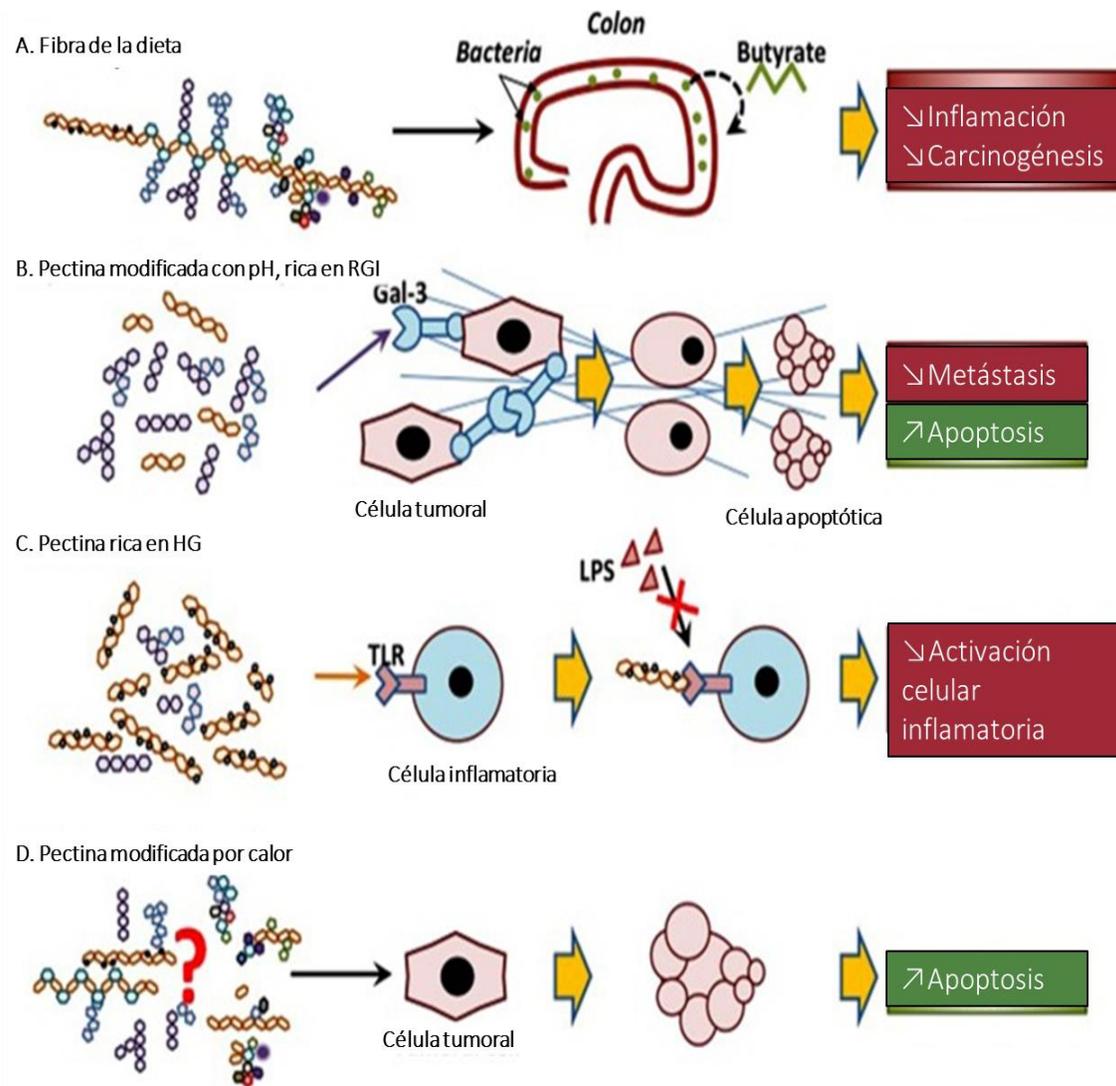


Figura 3. Representación esquemática de las distintas actividades biológicas de pectinas modificadas. Tomado de Leclere *et al.*, 2013.

2.4.1. Potencial Antiproliferativo de OP en Relación con su Peso Molecular

Se ha reportado que existe una posible relación de la actividad antiproliferativa de los OP dependiendo de su tamaño y peso molecular, así como la composición de azúcares de la que está formada su estructura.

Las fracciones de pectina cítrica modificada (PCM) obtenidas mediante tratamiento hidrotérmico (por autoclave), y compuestas con un alto contenido de HG, presentaron efecto antiproliferativo en

líneas celulares de hepatocarcinoma humano y cáncer de pulmón humano, la inhibición del crecimiento celular fue por la activación de caspasa-8 e inducción de autofagia (Leclere *et al.*, 2015). A su vez la PCM fraccionada en tamaño molecular de 30, 10 y 3 kDa, presentó efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer de colon (HTC116 y HT29) y de próstata (PC3), su efecto dependió del tamaño molecular, y se relacionó con un alto grado de esterificación, alto contenido de galactosa (PCM10/3) y ácido galacturónico (PCM30/10). Las fracciones de 30 a 10 kDa y de 10 a 3 kDa tuvieron mayor efecto sobre las células de cáncer de colon que sobre las células de próstata, induciendo muerte celular por necrosis y necroptosis sobre HTC116 y PC3 (do Prado *et al.*, 2019)

Por otro lado, Maxwell *et al.* (2015), realizaron la degradación de pectina de papa por hidrólisis ácida y la separación de fracciones concentradas de HG y RGI. En este sentido, RGI redujo significativamente la proliferación de células DLD1 (cáncer colorrectal), dependiente de la dosis. Al parecer, lo anterior se debió al desprendimiento celular, ya que el tratamiento con RGI en DLD1 condujo a una disminución en la expresión de la molécula de adhesión ICAM1, lo que lleva a la disminución de la proliferación celular. El análisis estructural de los RGI sugiere que los segmentos de HG en RGI (así como la presencia de cadenas laterales de azúcares neutros) son esenciales para la bioactividad (Maxwell *et al.*, 2015).

También Maxwell *et al.* (2016), evaluaron el efecto antiproliferativo de la fracción soluble de pectina de remolacha azucarera extraída por tratamiento alcalino, donde presentó efecto sobre la línea celular de cáncer de colon HT29 al inducir apoptosis. Su estructura química está compuesta por un alto contenido de ácido galacturónico, ramnosa y galactosa. Además, al eliminar la región de RGI de la ramificación de la estructura observaron que la actividad se mantenía, sugiriendo que la cadena central de HG también puede ser bioactiva (Maxwell *et al.*, 2016).

2.4.2 Interacción de OP con Receptores Celulares en Caco2

La línea celular de adenocarcinoma de colon Caco2 es un modelo apropiado de simulación *in vitro* para estudios de respuesta celular de CCR teniendo una relación confiable para estudios sobre la absorción de fármacos y otros compuestos después de la ingesta oral en humanos (Verhoeckx *et*

al., 2015). Esta línea celular presenta transportadores de azúcar a lo largo de la membrana siendo los siguientes: GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5 y SGLT1 (simportador de sodio-glucosa, una molécula de glucosa con 2 iones sodio) (Chen *et al.*, 2015). GLUT1, GLUT2 y GLUT3 absorben glucosa, GLUT2 junto con SGLT1 absorben glucosa y galactosa, GLUT5 absorbe fructosa (Mueckler y Thorens, 2013).

Estos receptores también se encuentran en distintos tipos de células normales, estadios de desarrollo y en distintas enfermedades. En células cancerígenas hay sobreexpresión de receptores y transportadores de azúcares en la membrana celular (Koepsell, 2017), debido a que en los tumores aumenta la captación celular de glucosa que alimenta la glucólisis aeróbica.

Por otro lado también se ha reportado que la expresión de SGLT1 promueve el crecimiento tumoral y es un predictor de la progresión en cáncer colorrectal (Guo *et al.*, 2011). La expresión de SGLT1 se ve afectada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR, ubicado en la superficie celular, es una glicoproteína transmembrana compuesta de tres partes: un dominio de unión extracelular, un dominio que abarca la región transmembrana hidrofóbica y un dominio de tirosina quinasa intracelular (Macarulla *et al.*, 2006). La unión del ligando al dominio extracelular activa la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis, la metástasis y protege a la célula de la apoptosis.

2.4.2.1 Galectina-3. A su vez Caco2 también expresa el receptor de membrana Galectina-3 (Bermúdez-Oria *et al.*, 2019), la importancia de este receptor consiste en que Gal-3 es una proteína de unión a β -galactósido, que se une a la porción de carbohidrato de las glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular. Se expresa en células normales y neoplásicas, regula el crecimiento celular, la adhesión celular, diferenciación y muerte celular. Se ha relacionado su expresión con la transformación neoplásica de algunos tipos celulares y con el potencial metastásico en ciertos tumores malignos (Dong *et al.*, 2018; Newlaczyl y Yu, 2011; Fortuna-Costa *et al.*, 2014).

En base a la actividad antiproliferativa de las fracciones de pectinas modificadas se ha reportado una importante relación en la interacción de las fracciones de pectina con un receptor de membrana Galectina-3 (Gal-3), al surgir esta interacción consecutivamente la proliferación celular disminuye en líneas celulares cancerígenas estudiadas como las de cáncer de colon (HCT116 y HT29) por

Pedrosa y colaboradores, 2020 y por do Nascimento et al. 2020. Las conclusiones de ambos estudios coinciden con las de Kapoor y Dharmesh, 2017, donde encontraron una relación en su composición química, la presencia de galactosa, ácido galacturónico y un menor peso molecular de las fracciones es lo que favorece la interacción y un mejor efecto de inhibición sobre Gal-3 en comparación con la pectina sin modificaciones.

2.4.2.2 Caspasa-8 y Caspasa-3. Por otro lado, la principal respuesta celular en base al efecto antiproliferativo de OP, sobre células de cáncer de colon, es la apoptosis. La caspasa-8 es un crucial iniciador en la apoptosis mediada por receptor de muerte celular. Implica la formación del complejo de señalización que induce la muerte que se compone de receptores de muerte, proteínas adaptadoras y procaspasa-8 que conducen a la dimerización y activación de la procaspasa-8. Finalmente, la caspasa-8 activada escinde las caspasas efectoras corriente abajo, lo que da como resultado la apoptosis. Se ha explorado que la caspasa-8 desempeña un papel destacado en el desarrollo del cáncer y sirve como marcador terapéutico o pronóstico potencial. Siendo que la regulación a la baja de caspasa-8 podría ser un mecanismo importante de resistencia a la quimioterapia.

El papel de la caspasa-3 en la apoptosis es dividir y activar las caspasas-6, -7 y -9 para descomponer las células apoptóticas antes de eliminarlas. Después de este proceso, la proteína caspasa-3 es escindida y degradada por las caspasas-8 y 10. La escisión secuencial y la activación de estas proteínas es crucial para la etapa de ejecución de la muerte celular programada. Su expresión puede ser indicador de prognosis en cáncer y quimiosensibilidad (Alberts *et al.*, 2015; Kashyap *et al.*, 2021).

3. HIPÓTESIS

El rango de peso molecular de los oligosacáridos de pectina (OP) determina su efecto antiproliferativo en la línea celular de cáncer colorrectal Caco2.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Conocer el efecto del peso molecular de los oligosacáridos de pectina sobre su actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer colorrectal Caco2

4.2. Objetivos Específicos

1. Extraer la pectina de la pulpa de remolacha por hidrólisis ácida.
2. Generar oligosacáridos de distintos pesos moleculares a partir de pectina de remolacha mediante hidrólisis hidrotérmica.
3. Analizar las características fisicoquímicas de las fracciones de oligosacáridos de pectina.
4. Evaluar el efecto antiproliferativo de OP de distinto peso molecular sobre la línea celular Caco2.
5. Evaluar el efecto aditivo de las fracciones de OP junto con Doxorrubicina sobre Caco2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materia Vegetal

Pulpa de remolacha es un subproducto de la obtención de etanol a partir de remolacha azucarera (*B. vulgaris*). El material se obtuvo de las instalaciones de Destiladora del Noroeste en Caborca, Sonora.

5.2. Reactivos

Los reactivos utilizados se adquirieron de la casa distribuidora Sigma-Aldrich y se enuncian a continuación: ácido clorhídrico, agua miliQ, alcohol etílico 96 %, acetona 99.5 %, agua bidestilada, monosacáridos de Sigma-Aldrich (ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa, inositol, manitol, ácido galacturónico), ácido sulfúrico, amoníaco 25 %, borohidruro de sodio, DMSO (dimetilsulfóxido), 1-metilimidazol, anhídrido acético, cloroformo, hidróxido de sodio, TMCA (ácido 3,4,5-trimetoxi-trans-cinámico), metanol 99.8 %, acetonitrilo, acetato de sodio, ácido trifluoroacético, DPPH (hidrato de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ABTS⁺ [sal de di amonio de 2,29-azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)].

Para medio de cultivo: medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomicina, L-glutamina, L-arginina, L-asparagina, bicarbonato de sodio, piruvato de sodio, doxorubicina, buffer PBS, tripsina, EDTA (ácido de etilendiaminotetraacético), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difenil tetrazolio), isopropanol acídico, todos provenientes de Sigma-Aldrich.

5.3. Extracción de Pectina

Se extrajo la pectina de remolacha por hidrólisis ácida de acuerdo con Li et al. 2015, con ligeras modificaciones. El material vegetal se suspendió en HCl 0.1M en una relación sólido líquido 1:10 (p/v) de muestra y HCl por 2 horas a 85 °C. Después de la hidrólisis se filtró el volumen total por una tela para filtrar y eliminar los restos sólidos. A continuación, se agregó 2 veces su volumen con alcohol etílico al 96 % y se dejó precipitar una noche en refrigeración (0-4 °C). Una vez precipitada la pectina se llevó a centrifugación a 10,000 g, 25 °C x 10 min y se realizaron tres lavados con alcohol (50, 75 y 96 %). Una vez lavada la pectina y en alcohol al 96 % se filtró a vacío con un embudo de filtración de vidrio (Robu Filter Borosilicate Glass 3.3 Porosity 3) y con acetona, una vez filtrado el alcohol y acetona se obtuvo el polvo de pectina por intercambio de solvente con acetona (Li *et al.*, 2015).

5.4. Obtención de Oligosacáridos de Pectina (OP)

Se preparó una solución de pectina a una concentración de 2 % (p/v) en agua bidestilada, se calentó por 2 h a 121 °C, bajo una presión de 17.2–21.7 psi (110-150 kPa). Lo anterior fue para obtener los oligosacáridos de pectina (OP) mediante hidrólisis hidrotérmica (Leclere *et al.*, 2015).

5.5. Ultrafiltración de OP

La solución de OP se llevó a fraccionamiento mediante ultrafiltración utilizando dos membranas de 1kDa y 10kDa de celulosa con una celda Amicon® con agitación (Merck Millipore, Alemania), para obtener las fracciones de peso molecular, bajo (<1 kDa), medio (1-10 kDa) y alto (>10 kDa) (Swennen *et al.*, 2005). Las soluciones separadas se congelaron a -80 °C para posterior liofilización. El material seco se almacenó en frascos ámbar, en un ambiente seco.

5.6. Caracterización Fisicoquímica de OP

La caracterización de OP, consistió en la identificación de los componentes de la estructura química. La metodología incluye la identificación de grupos funcionales por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, el contenido de monosacáridos neutros por cromatografía de gases, el contenido de compuestos fenólicos (ácido ferúlico (AF), y dímeros AF) y el contenido de ácido galacturónico por cromatografía líquida de alta presión.

5.6.1. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FT-IR de polvo seco de los oligosacáridos de pectina se registraron en un espectrómetro IR (Nicolet Instrument Corp. Madison, WI, EE. UU.). Las lecturas procesadas por transformada de Fourier se utilizaron para inferir el grado de metilación, según se reportó por Monsoor *et al.*, (2001).

5.6.2. Contenido de Monosacáridos Neutros

El contenido de monosacáridos de las fracciones de OP se determinó mediante la técnica de preparación de alditoles de acetato a partir de monosacáridos con algunas modificaciones según reportado por Blakeney y colaboradores (1983). Se usó como estándar interno inositol en cada muestra. Se llevó a cabo la hidrólisis de las muestras (20 mg) con 1 mL de ácido sulfúrico 3N a 100 °C por 3 h, después de enfriar con hielo para detener la reacción, se agregó 0.5 mL de amoníaco al 25 %. Los estándares (ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa e inositol (como estándar interno) se prepararon en 1 mg/mL y se hidrolizó 0.1 mL de cada estándar con 0.4 mL de ácido sulfúrico 7.5N y amoníaco al 25 %. Se redujeron los monosacáridos con solución de borohidruro de sodio (2 g) en dimetilsulfóxido (100 mL), preparado a 100 °C. Los alditoles

resultantes se acetilaron usando 1-metilimidazon (150 μ L) como catalizador y anhídrido acético (2 mL). Después de 10 minutos a temperatura ambiente se adicionó 6 mL de agua miliQ para descomponer el exceso de anhídrido acético. Se añadió cloroformo (2 mL) y se agitó en vortex para la separación de fases, se eliminó la fase superior y se realizaron 2 lavados con agua, se recuperó la fase inferior (donde están los acetatos de alditol) en un vial de 1 mL y se filtró por 0.45 μ m antes de pasar al tubo de inyección. Los acetatos de alditol se separan completamente mediante cromatografía de gases (Clarus 580, Perkin Elmer), con un detector de ionización de llama y una columna capilar DB 225 (15 m X 0,32 mm, J&W Scientific). Se inyectaron 2 μ L de muestra a 220 °C y con detección a 260 °C. con una temperatura del horno de 205 °C (Blakeney *et al.*, 1983).

5.6.3. Determinación de Ácido Galacturónico

El contenido de ácido galacturónico de las muestras de OP se determinó después de la hidrólisis de la muestra con ácido trifluoroacético 2N a 120 °C durante 2 h. La reacción se detuvo en hielo y los extractos se evaporaron al aire a 50 °C, se enjuagaron dos veces con 200 μ L de agua MiliQ. El extracto evaporado se solubilizo en 500 μ L de ácido sulfúrico 0.001N. Se utilizó manitol como estándar interno. Las muestras se filtraron a través de 0.45 μ m (Whatman) y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna MetaCarb H Plus (7.8 X 300 mm; Varian, St. Helens, Australia), usando como fase móvil ácido sulfúrico 0.1N (Wltered 0.2 m, Whatman) a 0,6 mL/min y 80 °C. Con un detector de índice de refracción Star 9040 (Varian, St. Helens, Australia) (Carvajal-Millan *et al.*, 2007).

5.6.4. Determinación de Ácido Ferúlico

Para la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos (ácido ferúlico (AF) y dímeros-AF) en las muestras de las fracciones de OP, se llevó a cabo la saponificación de 100 mg de muestra con 10 mL de NaOH 2N, se desplazó el aire con nitrógeno y se protegió de la luz dejando la

reacción en constante agitación por 2 h a 35 °C. Después se añadieron 100 µL de ácido 3,4,5-trimetoxi-trans-cinámico (TMCA, estándar interno, 5 mg), a pH 2.00 ± 0.02 ajustando con HCl 2N, para la acidificación. Los fenólicos se extrajeron dos veces con dietiléter. Los extractos secos se solubilizaron en 0.5 mL de metanol se filtraron (0,45 mm) y se inyectaron (20 mL) en RP-HPLC usando una columna Alltima (Alltech, Deerfield, IL) C18 (250 X 4,6mm de diámetro interno). La detección se realizó mediante absorbancia UV a 320 nm. El gradiente de elución se fue usando acetonitrilo y tampón de acetato de sodio 0.05M, pH 4.0 a 1 mL/min a 35 °C. Se utilizó un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 (Millipore Co., Milford, MA) para registrar los espectros de AF y dímeros. Se siguió la metodología reportada por Vansteenkiste y colaboradores (2004) con ligeras modificaciones.

5.7. Actividad Antioxidante

Las determinaciones de DPPH y ABTS⁺, están basados en principios similares, que permiten determinar la capacidad antioxidante por medio de reacción de transferencia de electrón al reducir un agente antioxidante para generar el radical ya sea DPPH o ABTS⁺ (Mendez-Encinas *et al.*, 2019).

5.7.1. Capacidad Antioxidante por DPPH

El ensayo de DPPH, (hidrato de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), se utiliza para predecir las actividades antioxidantes mediante el mecanismo en el que los antioxidantes actúan para inhibir la oxidación de lípidos, eliminando el radical DPPH y determinar la capacidad de eliminación de radicales libres. Para la determinación se prepararon los compuestos a utilizar en la reacción, Se preparó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) a 75 µg/mL, se disolvió 3.75 mg Trolox en 50 mL de agua HPLC y se ajustó pH a 7.2 con NaOH. De la solución concentrada se hicieron disoluciones para realizar la curva dosis-respuesta, con las concentraciones

de Trolox siguientes: 1, 1.9, 3.75, 7.50, 11.5, 15 y 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se preparó DPPH (91.3 μM), disolviendo 1.8 mg de DPPH en 30 mL de metanol (MetOH). Se agregaron 20 mL de agua bidestilada y se agitó rápidamente para preparar una disolución al 60% de MetOH, posteriormente se filtró por membrana 41 (Whatman) y se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente. Se utilizó dentro de 1 h. Se transfirió una alícuota (400 μL) de las fracciones de OP a un tubo de centrífuga de 2 mL y se agregaron 350 μL de metanol seguido de 750 μL de solución de DPPH, lo que resultó en un medio de reacción de metanol acuoso al 53 %. La mezcla se agitó con vórtex y se dejó en la oscuridad durante 35 min. Posteriormente se transfirió a una cubeta de 2 mL después de agitar en vórtex para lectura de absorbancia a 515 nm que se tomaron a los 40 y 60 min. La CI_{50} se determinó a partir del gráfico de % de inhibición de DPPH contra [Trolox], donde:

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = a[\text{Trolox}] + b \quad (1)$$

Donde a y b son valores numéricos obtenidos a partir de la ecuación lineal de la curva dosis-respuesta. Con los valores anteriores se calculó el % de inhibición de DPPH de las muestras con las siguientes ecuaciones (Malunga y Beta, 2015).

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = \left[1 - \frac{(A \text{ muestra} - A \text{ blanco})}{(A \text{ control} - A \text{ blanco})} \right] \times 100\% \quad (2)$$

$$[\text{equivalente de Trolox}] = \left[\frac{\% \text{ Inhibición de DPPH} - b}{a} \right] \quad (3)$$

5.7.2. Ensayo de Eliminación de Radicales ABTS+

En esta metodología, ambas fases de las muestras (soluble e insoluble) entran en contacto con el

radical ABTS⁺ [sal de di amonio de 2,29-azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]. Así, la parte soluble ejerce su capacidad antioxidante eliminando los radicales presentes en el disolvente (reacción líquido-líquido) y la parte insoluble (antioxidantes unidos a polisacáridos) ejerce su capacidad antioxidante en la interfase sólido-líquido (Rosa *et al.*, 2013).

El reactivo ABTS⁺ se preparó haciendo reaccionar una solución acuosa de ABTS a 7 mM con persulfato de potasio de 2.45 mM y se disolvió adicionalmente en la mezcla de etanol:agua (50:50 v/v). Se preparó Trolox 600 µM, para la curva dosis-respuesta con concentraciones de Trolox y ABTS⁺. Se añadieron 3 mL de reactivo ABTS⁺ a 5 mg de las muestras de OP y la mezcla se agitó con vórtex durante 2 min para realizar la reacción de superficie. Después de la centrifugación a 9200 g durante 2 min, se midió la absorbancia del sobrenadante ópticamente transparente a 734 nm exactamente 14 y 21 min de mezcla de la muestra con el reactivo ABTS. De la absorbancia obtenida se obtuvo el porcentaje de inhibición y de esta última se calculó la capacidad antioxidante equivalente de mM de Trolox (TEAC) por kg de muestra mediante una curva dosis-respuesta (Re *et al.*, 1999).

5.8. Cultivo Celular de Caco-2 y ARPE-19

Se cultivó la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB37™) (no se utilizó la línea de colon normal CCD841 por no llegar a confluencia 90-100 %), y la línea celular no cancerígena del epitelio pigmentado de la retina ARPE-19 (CLR-2302™), ambas líneas celulares crecieron en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con penicilina-estreptomina 1 %, L-glutamina 7.5 mL/L, L-arginina 0.116 g/L, L-asparagina 0.036 g/L, bicarbonato de sodio 2 g/L, piruvato de sodio 10 ml/L, suplementado con suero fetal bovino al 15 % para Caco2 y con 10 % SFB (suero fetal bovino) para ARPE-19, se incubaron a 37 °C con 5 % CO₂ en atmosfera húmeda. Se monitoreó el crecimiento celular sobre el microscopio óptico y se cambió el medio de cultivo cada 2-4 días, o dependiendo del estado del cultivo. Al alcanzar confluencia del cultivo del 90 %, las células se des adhieren de la superficie de la caja de cultivo al retirar el medio y lavar las células con solución salina de fosfato 1X (PBS) y con tripsina/ácido de etilendiaminotetraacético (EDTA) con 5 mL para Caco2 y 2 mL para ARPE-19, y se incuban

por 9 y 3 min respectivamente. Una vez des adheridas se neutralizó la tripsina-EDTA con la mezcla de D10F y PBS 1X, posteriormente todo el volumen se recuperó en un tubo falcón de 50 mL, para llevar a centrifugación a 300 g x 7 min a 4 °C. Se realizó la cuenta celular para recuperar un volumen de suspensión celular necesario y utilizar las células en los siguientes análisis ([Caco2] (ATCC® HTB37™) y ARPE-19 (CLR-2302™).

5.8.1 Prueba de Viabilidad Celular por Ensayo de MTT

La viabilidad celular se obtuvo realizando la prueba de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difenil tetrazolio), en una placa con 96 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA), se pusieron 2.0×10^4 células por pozo en Caco2 y 1.0×10^4 células por pozo en ARPE-19 en un volumen de 50 μ L por pozo, se incuban por 24 h, al siguiente día se agregaron sobre las células los tratamientos de OP a diferentes concentraciones (125, 250, 500, 1000 μ g/mL) y con cada peso molecular (<1, 1-10 y >10 kDa) para evaluar el efecto antiproliferativo, también se puso Doxorrubicina en concentraciones de 7.2, 14.5, 28.9 y 57.9 μ g/mL, como un fármaco antiproliferativo control, estas concentraciones se pusieron sobre la línea celular Caco2, sobre ARPE-19 para evaluar citotoxicidad celular se aplicaron las mismas concentraciones de las fracciones de peso molecular de OP, y con concentraciones menores de Doxorrubicina (3.6, 7.2, 14.5, 28.9 μ g/mL) por la alta toxicidad del fármaco en células normales. Se agregaron 50 μ l de tratamiento (tx) por pozo, y se incubaron las placas por 48 h a 37 °C con 5% CO₂ en atmosfera húmeda. Después de la incubación con las fracciones de OP, se retiró el volumen total del medio con los tratamientos (100 μ L), seguido de un lavado rápido con 100 μ L de solución salina de fosfato 1X (PBS), después se agregó 100 μ L de medio D15F (DMEM suplementado con 15% de SFB) y 10 μ L del reactivo de MTT (5mg/mL) y se dejó en incubación por 4 horas. Después de la incubación se agregó 100 μ L de isopropanol ácido (Sigma-Aldrich) y se homogeneizó hasta la disolución de los cristales de formazán precipitados en todos los pozos. La absorbancia a 570nm y 650nm se midió en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EX, ThermoLabSystem). La viabilidad celular del tiempo de incubación se expresa como un porcentaje de células viables relativo a las células no tratadas (control negativo) igual que a las células tratadas (Alday *et al.*, 2015; do Nascimento *et al.*, 2020; Rajulapati *et al.*, 2021).

5.8.2 Combinación de Tratamientos Fracciones de OP con Doxorrubicina

Para conocer un posible sinergismo presente en la combinación de tratamientos de Doxorrubicina y las fracciones de cada peso molecular (PM) de los oligosacáridos de pectina, se realizó la mezcla de las mismas concentraciones de cada tratamiento individual estudiados en Caco2. Para cada fracción de OP <1, 1-10 y >10 kDa se utilizaron las concentraciones siguientes: 125, 250, 500, 1000 µg/mL, más la adición de Doxorrubicina en estas concentraciones 7.2, 14.5, 28.9 y 57.9 µg/mL. Quedando la combinación de tratamientos de la siguiente manera: 125 + 7.2, 250 + 14.5, 500 + 28.9, 1000 + 57.9 µg/mL (OP + Dox). Una vez expuestas estas combinaciones de tratamientos sobre Caco2 se realizó la prueba de MTT como se describió anteriormente.

5.8.2.1 Análisis de la combinación de tratamientos por isoblograma. Para realizar el análisis de los resultados de proliferación celular de Caco2 con las combinaciones de tratamientos anteriores, se utilizó el método de isoblograma, el cual tiene la finalidad de estudiar las interacciones de las drogas o fármacos de interés, en nuestro caso los tratamientos (Doxorrubicina y cada fracción de peso molecular de los oligosacáridos de pectina). Para evaluar la interacción de las drogas, primero se obtiene la concentración inhibitoria del 50 % (CI50) del crecimiento de población celular correspondiente a cada droga, a partir de la acción de los tratamientos individuales sobre Caco2, las CI50 individuales se obtuvieron de las pruebas de MTT anteriores.

De manera general la eficacia de la combinación de dos fármacos se muestra en una gráfica, donde el eje de las **x** y el eje de **y** representan las dosis de las drogas **X** y **Y**, respectivamente, y **A** y **B** representan la dosis de la misma eficacia cuando ambas drogas son usadas solas, es decir su eficacia individual que se expresa con su CI50, que se obtiene a partir de la ecuación de la pendiente, una vez graficada el % de proliferación celular obtenido por cada concentración estudiada del fármaco. La base para obtener la interacción de drogas es estableciendo primero la línea aditiva. Para esto se obtienen primero las CI50 individuales de cada fármaco, a partir de las concentraciones de **A** y **B** se conectan como una línea aditiva. Cuando se utilizan dos fármacos en combinación se establecen concentraciones en proporciones fijas de cada fármaco, es decir que, en combinación, la proporción del fármaco siempre será la misma. Y las concentraciones a utilizar en la

combinación son un mínimo de cuatro concentraciones que estén por arriba y por debajo de la CI50 individual de cada fármaco (**A** y de **B**). Se utilizaron las concentraciones mencionadas en el Cuadro 1, donde la suma de las concentraciones se expresó en forma de logaritmo (Log), el cual se utilizó para la presentación de resultados de proliferación.

Cuadro 1. Concentraciones de la combinación de tratamientos y su Log correspondiente.

Componente	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Dox ($\mu\text{g/mL}$)	7.2	14.5	28.9	57.9
OP ($\mu\text{g/mL}$)	125	250	500	1000
Suma de Concentraciones	132.2	264.5	528.9	1057.9
Log de la suma de conc.	2.121	2.422	2.723	3.0244

Una vez evaluadas las combinaciones, se determina la CI50 de cada fármaco en combinación, es decir la CI50 de **a** (**Dox (A)** en combinación con **OP (B)**) y la CI50 de **b** (**OP (B)** en combinación con **Dox (A)**), estos valores se plasman en las coordenadas horizontal y vertical de la gráfica de aditividad, a partir del valor de CI50 en combinación (**a** y **b**) y de su posición en la gráfica se puede observar el efecto sinérgico entre los dos fármacos de acuerdo. Si las dosis de **a** o de **b**, se encuentran por debajo de la línea aditiva se clasifica como sinérgico o aditivo, por arriba de la línea, se clasifica como subaditivo, como se representa en la Figura 4.

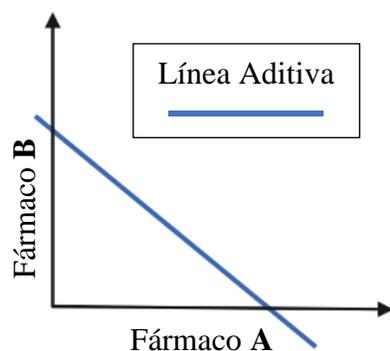


Figura 4. Gráfico de isoblograma

Para conocer de manera específica si la combinación de los fármacos presenta aditividad o no, se utiliza la siguiente ecuación de efecto aditivo (4):

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1 \quad (4)$$

Donde se sustituyen los valores de las CI50 individuales de los fármacos (**A** y **B**) y CI50 de los fármacos en combinación (**a** y **b**). Cuando el resultado de este cálculo es **1** la combinación presenta un efecto aditivo, **<1** efecto sinérgico o super-aditivo, **>1** efecto sub-aditivo. Este nos confirma los datos obtenidos por la gráfica anterior (Huang *et al.*, 2019; Tallarida, 2000).

5.9. Análisis Estadístico

En los experimentales correspondientes a la caracterización fisicoquímica se realizó estadística descriptiva para reportar su media, desviación estándar y coeficiente de variación por cada prueba. En los experimentales correspondientes al efecto proliferativo de OP por PM en Caco2, se realizó un análisis completamente al azar por ANOVA de una vía, con prueba de Tukey. Todos los análisis anteriores se realizaron en el programa de análisis de datos NCSS 2019.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis FTIR

Se utilizó espectroscopía FTIR para caracterizar la identidad molecular de los OP obtenidos por hidrolisis hidrotérmica. Como se muestra en la Figura 5, todas las muestras mostraron un perfil característico de FTIR. Se observaron bandas de estiramiento en el rango de 3200-3600 cm^{-1} correspondientes a los grupos $-\text{OH}$ y 3000-2800 cm^{-1} para vibración de estiramiento C-H, relacionados con metilo y metileno. Las bandas a 1760-1730 cm^{-1} corresponden a grupos carboxilo esterificados y las de 1630-1600 cm^{-1} se relacionan con grupos carboxilo no esterificados (Peng *et al.*, 2016). Se observa en la Figura 5 que la intensidad de las bandas de absorción de 1740 cm^{-1} y 1644 cm^{-1} de las tres fracciones de peso molecular de los OP obtenidas mediante hidrolisis hidrotérmica, se modifica significativamente indicando un bajo grado de metoxilación. Estas bandas se asocian con grupos carboxilo esterificados e ionizados en moléculas de la pectina, lo que sugiere que los enlaces éster se rompieron durante el proceso de degradación por hidrolisis hidrotérmica. Cabe señalar que el rango de la banda de absorción de vibraciones de estiramiento O-H de la fracción >10 kDa fue menor que el del resto de las fracciones, lo que indica la reducción de la interacción de hidroxilo entre las moléculas de la estructura de los OP de peso molecular >10 kDa, que podría ser causada por la destrucción de las cadenas laterales como resultado del tratamiento de fraccionamiento de hidrolisis hidrotérmica. Las bandas débiles de 1400 cm^{-1} a 1250 cm^{-1} , se atribuyeron al enlace hidroxilo fenólico y al estiramiento C-O del grupo fenilo (Liang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018). Además, las bandas alrededor de 1000 cm^{-1} asociadas con las vibraciones de estiramiento C-O podrían estar relacionadas con C-O-H y C-O-C del anillo de azúcar en carbohidratos (Huang *et al.*, 2020). Un ejemplo de la similitud en identidad molecular de OP se muestra en la Figura 6, donde los FTIR de las fracciones de pectina cítrica modificada con enzimas (EMCP-N), presentan números de ondas en posiciones similares a los FTIR de los OP obtenidos de remolacha azucarera de nuestro trabajo, y confirmando lo mencionado anteriormente sobre las posiciones de las bandas (Zhang, *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2019).

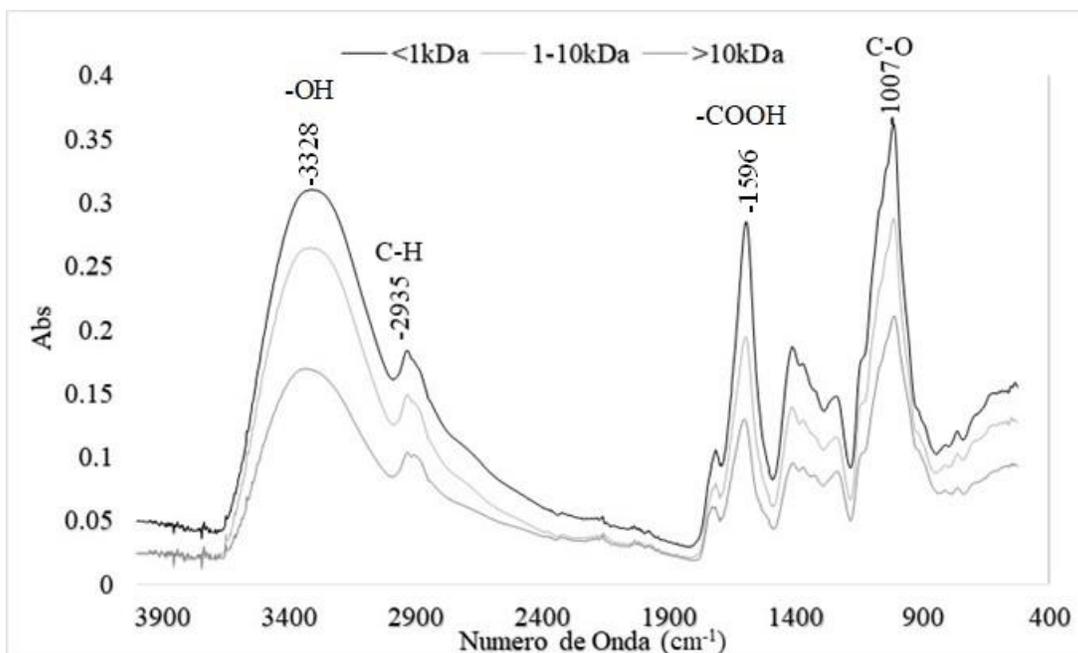


Figura 5. FTIR de los oligosacáridos de pectina de las fracciones de peso molecular de <1, 1-10 y >10 kDa.

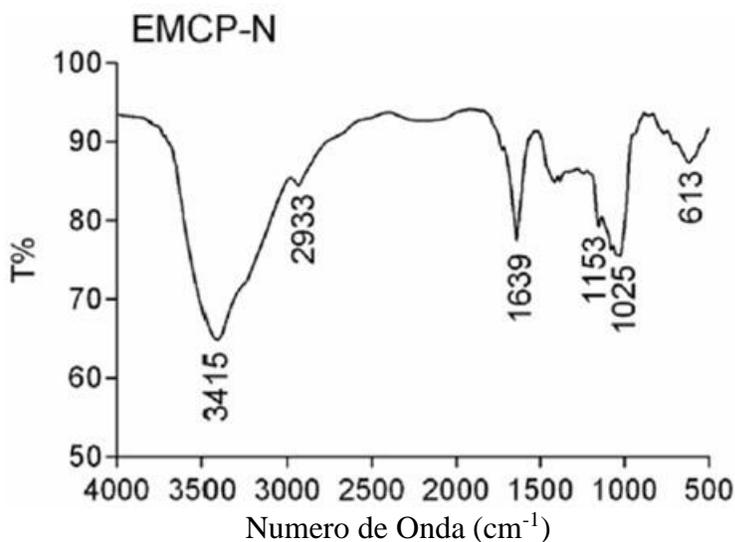


Figura 6, FTIR de fracciones de pectina cítrica modificada con enzimas (EMCP-N), reportado por (Zhang, *et al.*, 2021)

Los análisis de FTIR de las tres fracciones de peso molecular de OP, muestran que aún con el tratamiento de degradación y fraccionamiento de la estructura de la pectina con presión y calor mediante el tratamiento hidrotérmico, se mantiene la identidad de la molécula.

6.2. Composición de Monosacáridos y Ácido Galacturónico

A partir de 750 g de pulpa de remolacha azucarera se extrajeron 48.5 g de pectina, con un rendimiento de 6.46% (peso pectina/p pulpa). Después de la degradación de 20 g de pectina en oligosacáridos de pectina y fraccionados en pesos moleculares de <1, 1-10 y >10 kDa, se obtuvieron 8.08 g, 4.02 g y 8.4 g respectivamente (1.04, 0.5, 1.1% peso OP/peso pectina).

Con base al contenido de monosacáridos y ácido galacturónico de nuestras muestras se realizó el siguiente análisis y comparación del contenido de oligosacáridos de pectina con el de la pectina de remolacha azucarera.

En el Cuadro 2 se muestra la composición de la pectina extraída de la remolacha por condiciones ácidas, reportado por (Ohlmaier-Delgadillo *et al.*, 2021). De acuerdo con los resultados podemos observar que el contenido en la composición de monosacáridos de la pectina extraída de la pulpa de remolacha muestra cambios evidentes después de ser degradada y fraccionada por una hidrólisis hidrotérmica (HT) como lo muestra la composición de monosacáridos de las tres fracciones en el Cuadro 3: <1, 1-10 y >10 kDa. Donde se observa que entre las tres fracciones de OP la composición de monosacáridos no presenta una gran variación entre sus valores, esto puede indicar que la composición de monosacáridos en la estructura química de la pectina se mantiene aun después de la degradación por hidrolisis hidrotérmica (HT) mediante autoclave, sin embargo, el contenido de ácido galacturónico sí varía, siendo que la fracción menor a 1 kDa tiene un valor menor en comparación con las fracciones de 1-10 y >10 kDa, que tienen un contenido similar. A su vez el contenido de ácido galacturónico varía dependiendo de la fuente vegetal y del método de obtención de OP (Zhang *et al.*, 2021). Después del tratamiento de degradación hidrotérmica, la composición de ramnosa y arabinosa aumentó significativamente, así como el contenido de ácido galacturónico total, siendo este mayor en comparación al de pectina. La composición de xilosa, manosa y glucosa tuvieron valores similares al de la pectina, y la galactosa disminuyó ligeramente en comparación. Lo anterior refiere a que la estructura de la pectina presento una separación de las regiones ramificadas de la cadena central como Ramnogalacturonano tipo I y tipo II, al igual que los arabinogalactanos siendo estas de gran importancia en la pectina de remolacha en comparación con pectinas comerciales cítricas. Estas regiones, como su nombre lo especifica, están compuestas principalmente de ramnosa, arabinosa y galactosa. Un contenido mayor de glucosa puede ser por

la conversión de galactosa a glucosa durante el proceso de hidrólisis hidrotérmica (Liu *et al.*, 2020). En base a esto, es posible que los oligosacáridos obtenidos correspondan en su mayor parte a restos de RGI, RGII, y a la degradación de la cadena central de la pectina HG.

Cuadro 2. Composición química de pectina de remolacha azucarera (Ohlmaier-Delgadillo *et al.*, 2021).

Componente	Contenido (mg/g de pectina b.s.)
Ácido galacturónico	52.2±1.6
Ramnosa	1.50±0.02
Arabinosa	3.60±0.04
Xilosa	1.20±0.02
Manosa	5.00±0.04
Galactosa	20.7±0.4
Glucosa	12.3±0.2
Ácido Ferúlico	2.1±0.1

Cuadro 3. Comparación de composición de monosacáridos de los OP extraídos de remolacha azucarera y de fracciones de pectina cítrica modificada.

Monosacárido (g/100g)	Peso molecular (kDa)					
	Oligosacáridos de pectina de remolacha azucarera			Fracciones de pectina cítrica modificada (do Prado <i>et al.</i> , 2019)		
	<1	1-10	>10	3	10/3	30/10
Ácido Galact.	56.3 ±2.5	73.2 ±3.7	79 ± 9.0	86.0±0.1	69.7±7.3	80.0±0.2
Ramnosa	7.00 ±0.1	6.49 ±0.0	6.19 ±0.0	1.7±0.0	2.0±0.0	2.7±0.0
Arabinosa	9.4 ±0.1	9.27 ±0.0	8.77 ±0.1	0.8±0.0	0.9±0.1	1.1±0.0
Xilosa	0.48 ±0.0	0.43 ±0.0	0.43 ±0.0	0.6±0.3	1.1±0.1	0.5±0.0
Manosa	4.53 ±0.03	5.49 ±0.0	4.97 ±0.1	0.5±0.1	1.4±0.1	1.2±0.0
Galactosa	7.8 ± 0.1	8.77 ± 0.0	8.45 ±0.1	5.5±0.1	20.7±7.8	11.2±0.0
Glucosa	10.08 ±0.0	10.51 ±0.0	10.05 ±0.1	1.0±0.2	0.7±0.2	1.6±0.2

Por otra parte, el contenido de monosacáridos de las fracciones de OP de nuestro análisis también se comparó con el contenido de monosacáridos de fracciones de peso molecular de pectina cítrica modificada (PCM) por hidrólisis hidrotérmica por autoclave reportada por (do Prado *et al.*, 2019). La composición de monosacáridos de las fracciones de PCM, presentaron una menor proporción de ramnosa, arabinosa, manosa y glucosa en comparación con las fracciones OP, pero con un contenido de xilosa similar. No obstante, el contenido de galactosa en PCM varia

significativamente entre sus fracciones, en comparación de los OP del presente trabajo que presentan un valor similar entre fracciones. A sí mismo, el contenido de ácido galacturónico es mayor en la fracción de 3 kDa de PCM en comparación con la de 1kDa de nuestros oligosacáridos de pectina.

La composición de monosacáridos de las fracciones de PCM se muestra con diferencias a los OP, debido a la fuente vegetal y método de obtención, presentando variaciones entre su estructura química en la cantidad de monosacáridos.

6.3. Contenido de Ácido Ferúlico

En el Cuadro 4 se muestra el contenido de ácido ferúlico presente en las fracciones de OP de distinto peso molecular. El ácido ferúlico presente en la estructura de los OP se encuentra en cantidades extremadamente pequeñas cercanas al límite de detección. Aun así, la fracción de OP <1 kDa, es la que presenta un contenido mayor de ácido ferúlico total en comparación al resto de las fracciones. Siendo que el contenido de este disminuyó con forme aumento el tamaño de peso molecular. Esto se puede relacionar a que la estructura de OP de menor tamaño presenta una mayor disponibilidad de ácido ferúlico en su estructura. Donde la fracción de mayor peso molecular (>10 kDa) es la que presento un menor contenido.

Cuadro 4. Contenido de ácido ferúlico y sus dímeros en las fracciones de OP

Compuesto	<1kDa	1-10kDa	>10kDa
	(µg/mg)		
AF	0.20±0.05	0.07±0.03	0.04±0.00
Di-AF total	0.006 ±0.001	0.002±0.001	n.d.
8-5'-diFA	0.003±0.002	0.0008±0.001	n.d.
8-O-4' -diFA	n.d.	n.d.	n.d.
8-5'benzofuran-diFA	n.d.	n.d.	n.d.
5-5'-diFA	0.003±0.00	0.0012±0.001	n.d.
Tri-AF	n.d.	n.d.	n.d.

n.d: no detectado

Saulnier y Thibault, (1999), reportaron que el ácido ferúlico en oligómeros de pectina se encuentra unido a dímeros y trímeros de arabinosa, y a dímeros de galactosa. a su vez se estimaron que el contenido de ácido ferúlico presente en la estructura de la pectina es de un 50% unido a residuos de arabinosa y un 50% en residuos de galactosa, esto último es referente a la composición principal de la región de ramnogalacturonano I. El contenido de ácido ferúlico puede variar conforme al tratamiento de extracción, así como de la fuente vegetal. En nuestro caso la pulpa de remolacha azucarera que fue nuestra fuente de extracción de pectina y oligosacáridos es un residuo de la industria agroindustrial, por lo que el hecho de que haya tenido varios procesos fisicoquímicos puede afectar en su composición (Gawkowska *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 2013). El contenido de ácido ferúlico total presente en nuestro resultado corresponde a toda la muestra por fracción de peso molecular, no podemos especificar a detalle si este contenido total se encuentra unido a los oligosacáridos de pectina o no, para eso será necesario otro análisis.

6.4. Capacidad Antioxidante

La actividad antioxidante de las fracciones de OP fueron evaluadas mediante las determinaciones de DPPH y ABTS⁺, ambos métodos están basados en principios similares, que permiten determinar la capacidad antioxidante por medio de reacción de transferencia de electrón al reducir un agente antioxidante para generar el radical ya sea DPPH o ABTS⁺ (Mendez-Encinas *et al.*, 2019). El Cuadro 5 muestran los resultados de las determinaciones mencionadas, donde los valores de DPPH disminuyen con forme aumenta el peso molecular de las fracciones OP, mientras que en ABTS⁺ se mantienen similares, disminuyendo muy poco entre fracción con forme aumenta el peso molecular de estas.

Zhang et al. el (2016), señalaron que, entre mayor peso molecular de polisacáridos y oligosacáridos, se considera que las estructuras se presentan empaquetadas por fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que puede dificultar la exposición de grupos hidroxilo activos, resultando en una reducción de la capacidad antioxidante. Por el contrario, los polisacáridos de bajo peso molecular presentan una estructura no compacta con más grupos hidroxilo disponibles, una mayor superficie y mejor solubilidad en agua, por lo que presentan más posibilidades de interactuar con

los radicales libres (Yeung *et al.*, 2021; Z. Zhang *et al.*, 2016). A su vez, también se ha relacionado el alto contenido de ácido galacturónico y el bajo peso molecular con una mayor capacidad antioxidante, también se relacionaron con sus capacidades de donación de electrones o hidrógeno (Xiong *et al.*, 2021).

Por lo tanto, se puede deducir que en las fracciones de los oligosacáridos de pectina se encuentren estructuras químicas con actividad antioxidante, las cuales será necesario identificar a detalle en futuras investigaciones. De manera general, las tres fracciones de peso molecular de OP cuentan con actividad antioxidante, lo cual podría beneficiar los efectos biológicos de estas moléculas en los organismos.

Cuadro 5. Actividad antioxidante de las fracciones de oligosacáridos de pectina.

OP (kDa)	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TEAC/g}$)	
Muestra	ABTS⁺	DPPH
<1	51.3 \pm 0.1	40.7 \pm 5.0
1-10	50.9 \pm 0.2	37.4 \pm 0.6
>10	50.0 \pm 1.0	32.8 \pm 0.5

*Los valores de TEAC se obtienen a partir de la capacidad de un antioxidante individual o una mezcla para inhibir el ABTS⁺ en un punto de tiempo definido, en relación con Trolox (antioxidante estándar que se utilizó en la determinación).

Se ha considerado que la composición de polifenoles dentro de la estructura de la pectina podría mejorar su actividad antioxidante. Teniendo en cuenta de que el mismo varía en diferentes pectinas, así como su contenido de grupos hidroxilos. Siendo que el grupo hidroxilo es el que reacciona con el radical DPPH, cuanto mayor sea el contenido de grupos hidroxilo, mayor será la capacidad de eliminación de radicales DPPH (Chen *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2019; Ahn *et al.*, 2017)

Los métodos de DPPH y ABTS se consideran métodos indirectos, ya que se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, donde el uso de algunos radicales libres metaestables, coloreados, con fuerte absorción en el espectro visible, sirven como herramienta para determinar actividad estabilizadora de radicales libres. Sin embargo, con estos métodos se puede medir solo la capacidad para donar hidrógenos, y en muchos casos, no se correlacionan con la capacidad antioxidante *in vivo* como con los métodos directos que están basados en el estudio del

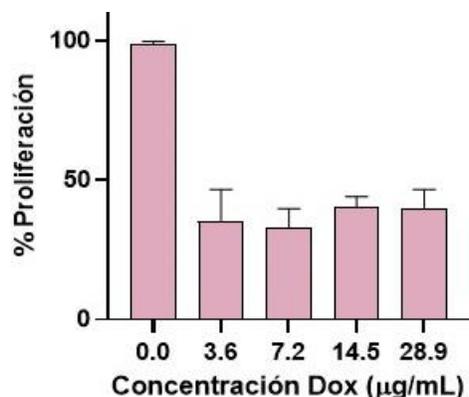
efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros; siendo estos los que constituyen el sistema más frecuente debido a la importancia de su oxidación en el desarrollo de enfermedades, así como en el deterioro de la calidad de los alimentos (Kuskoski *et al.*, 2005; Londoño, n.d.). En cuestión de efectividad en determinar la capacidad antioxidante, se considera el método ABTS mejor que DPPH, de acuerdo a un estudio extensivo en alimentos por Floegel *et al.* (2011). Sus hallazgos sugieren que el ensayo ABTS es superior al ensayo DPPH cuando se aplica a una variedad de alimentos vegetales que contienen compuestos antioxidantes hidrófilos, lipófilos y altamente pigmentados (Floegel *et al.*, 2011).

6.5. Efecto Antiproliferativo de OP

6.5.1. Citotoxicidad Celular

Como línea celular control, normal y no cancerígena, se utilizó ARPE-19, para evaluar si los oligosacáridos de pectina de distinto peso molecular presentan citotoxicidad hacia una línea celular normal. A su vez también se evaluó el efecto de Doxorubicina sobre ARPE-19, como control positivo de inhibición celular, Figura 7. Doxorubicina tuvo un efecto fuerte en el crecimiento celular de ARPE-19, donde todas sus concentraciones (3.6, 7.2, 14.5 y 28.9 $\mu\text{g/mL}$) inhibieron el crecimiento celular en más del 50%, reforzando el hecho de que doxorubicina es citotóxico también para células normales no cancerígenas (Varela-López *et al.*, 2019).

La respuesta de ARPE19 a las fracciones de peso molecular de los oligosacáridos de pectina se muestra en la Figura 8, donde los OP con distinto peso molecular se evaluaron con las siguientes concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. El crecimiento celular de ARPE-19 al OP de <1 kDa presentó una disminución de 20% a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 30% a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, La fracción de 1-10 kDa de OP, presentó una disminución de un 25% de crecimiento celular a 1000 $\mu\text{g/mL}$. El oligosacárido de la fracción >10 kDa, no tuvo efecto en la proliferación celular de ARPE-19, siendo este no citotóxico para la línea celular normal.



Figuras 7. Efecto citotóxico de Dox sobre la línea celular ARPE-19.

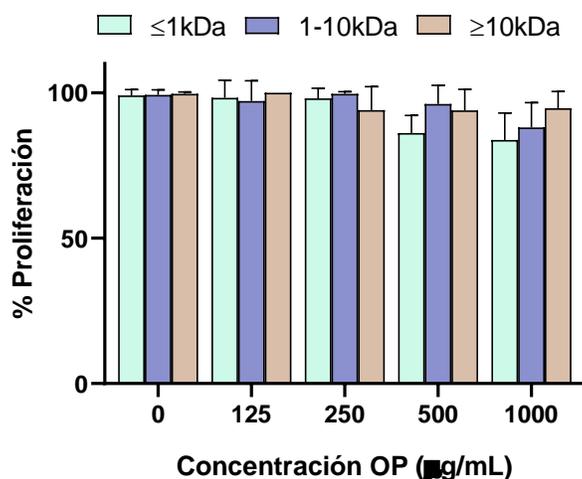


Figura 8. Efecto citotóxico de las fracciones de oligosacáridos de pectina sobre la línea celular ARPE-19

6.5.2. Efecto Antiproliferativo

En las siguientes graficas se muestran los resultados de la prueba de viabilidad celular en la línea celular de adenocarcinoma de colón Cao2 en respuesta a la exposición de los oligosacáridos de pectina de distinto peso molecular (<1, 1-10, >10 kDa), con distintas concentraciones (125, 250, 500 y 1000 µg/mL) a partir del ensayo de MTT. Se utilizó como control positivo al fármaco Doxorubicina con las siguientes concentraciones 7.2, 14.5, 28.9 y 57.9 µg/mL y como control negativo PBS 1X, (tampón de fosfato salino), que fue también donde se disolvieron las muestras

de las fracciones de OP. En la Figura 9, se presenta la respuesta del crecimiento celular de Caco2 a Dox (control positivo), de manera dosis dependiente, es decir conforme se aumentó la concentración del fármaco, se disminuye el crecimiento celular de Caco2. En la Figura 10, se muestra el grupo de gráficos de la respuesta en crecimiento celular de Caco2 con los oligosacáridos de pectina (OP) de distinto peso molecular y concentración. Caco2 en crecimiento con el oligosacárido con peso molecular de <1 kDa presenta una disminución entre un 20-30% en la proliferación celular a partir de los 500 µg/mL, con un aumento del 70% en inhibir el crecimiento celular con una concentración de 1000 µg/mL. De esa gráfica se obtuvo la concentración inhibitoria del 50% de la proliferación celular (CI50), del OP de <1 kDa fue de 893 µg/mL sobre Caco2. El oligosacárido de pectina de 1-10 kDa no presentó un efecto antiproliferativo sobre Caco2 en ninguna concentración, efecto similar se obtuvo con la fracción >10 kDa de OP. De las gráficas anteriores se recopiló la concentración inhibitoria del crecimiento celular del 50% (CI50) en Caco2, solo en los casos que, si fue posible, los cuales fueron la CI50 del OP de <1 kDa fue de 893 µg/mL y del control positivo de efecto antiproliferativo de Doxorubicina, que fue de 22.35 µg/mL, sobre Caco2, en los que no fue posible determinar el CI50 se les asignó el valor de >1000 µg/mL, ya que esa fue la concentración más alta evaluada. Estos datos son necesarios para el isoblograma.

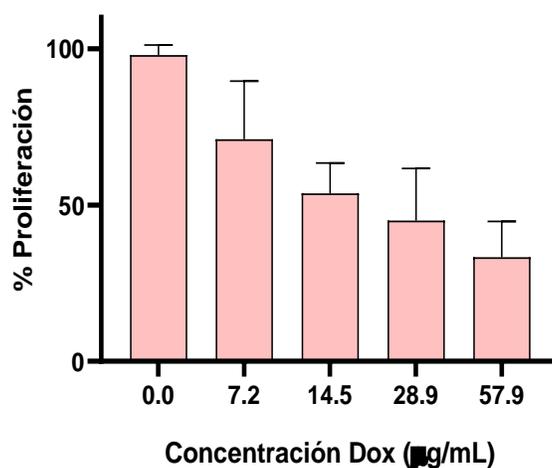


Figura 9. Efecto antiproliferativo con Dox sobre Caco2

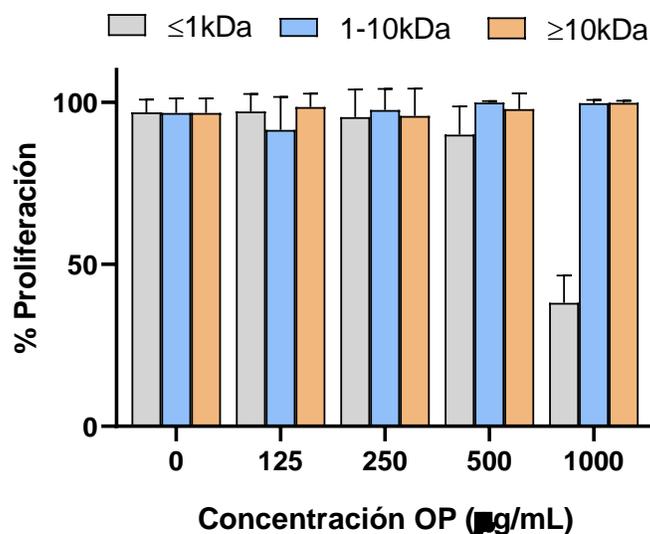


Figura 10. Efecto antiproliferativo de fracciones de oligosacáridos de pectina sobre células de adenocarcinoma colorrectal Caco2.

En un estudio por Wu *et al.*, 2020, se evaluó el efecto antiproliferativo de oligosacáridos de pectina obtenidos por modificación enzimática, las fracciones WSP, EP-1, EP-2 y EP-3 con los siguientes pesos moleculares respectivos 5.93×10^5 , 5.26×10^5 , 4.72×10^5 , y 3.70×10^5 g/mol, se evaluaron en líneas celulares cancerígenas de pecho MCF-7 y carcinoma de pulmón A549, (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.063 mg/mL). Sus resultados reflejaron una disminución en la proliferación celular de manera dosis-dependiente. Encontraron una relación en la inhibición celular con la inhibición de Galectina-3, donde WSP tuvo mayor afinidad a este receptor y a su vez mayor efecto antiproliferativo en ambas líneas celulares.

Por otro lado, do Nascimento et al. el 2020 concluyeron que la actividad biológica de oligosacáridos provenientes de pectina de jaboticaba pudiera depender del contenido de ácido galacturónico. En este sentido, un mayor contenido de ácido galacturónico presenta un mayor efecto inhibitor de Galectina-3 y reducción de la viabilidad celular en cáncer de colon humano (HT116 y HT29).

Bermúdez-Oria et al. el 2019, extrajeron oligosacáridos de pectina de olivos con peso molecular menor a 3 kDa y con un alto contenido de ácido galacturónico. Estos OP presentaron efecto en disminuir la proliferación celular de Caco-2 a una concentración de 3.33 mg/mL, sugirieron que esto último se debió a la inducción de apoptosis y no a la inhibición de crecimiento celular por toxicidad. Esto último debido a la activación de caspasa-3, con la interacción de galectina-3 siendo

que esta última se ve relacionada a la metástasis tumoral. Sin embargo, observaron que en el tratamiento con concentración de 1.11 mg/mL e incubada por un periodo de 7 días se promovió la proliferación celular, relacionaron lo anterior con la capacidad celular de proliferar después de un periodo de exposición a los oligosacáridos de pectina de olivos y con que disminuyo la expresión de Galectina-3. Por otro lado, también estudiaron la línea celular, de leucemia monocítica (THP-1) donde las concentraciones de 3.33 y 10 mg/mL de OP de olivos, presentaron también un efecto de inhibición de proliferación celular, pero en menor medida que sobre Caco2.

6.5.3. Sinergismo en Combinación de Doxorrubicina con OP

En la evaluación de la combinación de tratamientos de Dox más cada fracción de peso molecular de oligosacáridos de pectina (OP), se llevó a cabo un isoblograma para identificar si la combinación de estos tratamientos presentaba sinergismo, es decir si Dox o los OP se beneficiaban de la combinación, donde a partir de las CI50 de los tratamientos individuales y las CI50 de las combinaciones y con la ecuación de efecto aditivo se conoció si su combinación presentaba sinergismo o no. En la Figura 11 se presentan las gráficas del efecto en la proliferación celular de las combinaciones sobre Caco2.

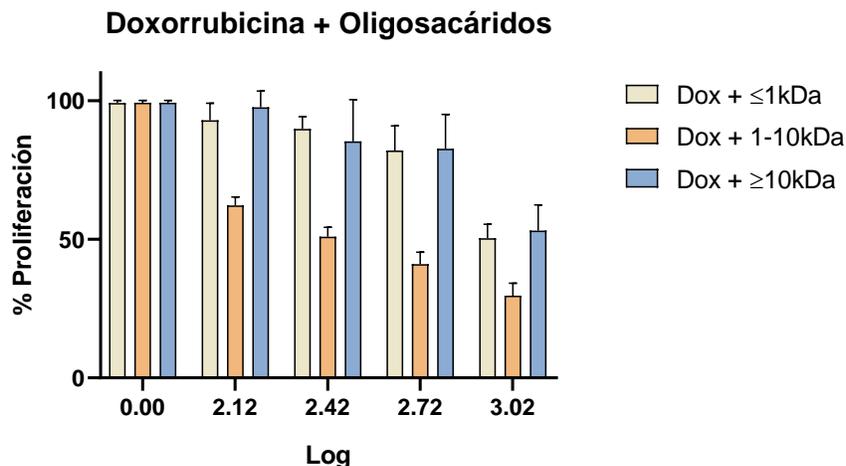


Figura 11. Efecto de la combinación de tratamiento sobre proliferación celular de Caco2.

A partir de los datos de la gráfica de la Figura **11**, se obtuvieron las CI50 de Doxorubicina en cada combinación de tratamientos, y las CI50 de cada OP dentro de la combinación. Estos valores se obtuvieron de acuerdo con la metodología de isoblograma, y a partir del valor de Log correspondiente.

Recordando la ecuación para conocer el efecto aditivo (4), donde **a**: CI50 de Dox en la combinación de tratamientos, **b**: CI50 del oligosacárido de pectina en la combinación de tratamiento; **A**: CI50 de Dox en su tratamiento individual y **B**: CI50 de OP en su tratamiento individual.

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1 \quad (4)$$

Para el oligosacárido de pectina <1 kDa en combinación con Dox, se obtuvo **a**: 60.03 µg/mL y **b**: >1000 µg/mL, **A**: 22.06 µg/mL, **B**: 893 µg/mL, sustituyendo los datos en la ecuación se obtiene un valor de **3.8**, siendo este mayor que 1, la combinación de estos tratamientos tiene un efecto subaditivo. Por el contrario, la combinación del oligosacárido de pectina de 1-10 kDa con Dox, se obtuvo **a**: 15.86 µg/mL y **b**: 272.53 µg/mL, **A**: 22.06 µg/mL, **B**: >1000 µg/mL, sustituyendo los datos en la ecuación se obtiene un valor de **0.9**, siendo este menor que 1, la combinación de estos tratamientos tiene un efecto aditivo.

Sin embargo, la combinación del oligosacárido de pectina >10 kDa con Dox, se obtuvo **a**: >100 µg/mL y **b**: >1000 µg/mL, **A**: 22.06 µg/mL, **B**: >1000 µg/mL, sustituyendo los datos en la ecuación se obtiene un valor de **5.3**, siendo este mayor que 1, la combinación de estos tratamientos tiene un efecto subaditivo.

En resumen, la combinación de la fracción de 1-10 kDa de OP con Dox, es la única que presenta un ligero efecto aditivo. Esto sugiere que la combinación de ambos beneficia el uno al otro. Comparando las CI50 de los tratamientos individuales con las CI50 de las combinaciones (Dox + fracción OP), la CI50 disminuyó para cada componente estando en combinación.

Para lograr inhibir el crecimiento celular de Caco2 al 50%, la CI50 de Doxorubicina en combinación bajó de 22.06 µg/mL (Dox CI50 en tratamiento individual) a 15.85 µg/mL (Dox CI50 en tx individual), y la CI50 del OP de 1-10 kDa bajó a 272.53 µg/mL de ser >1000 (OP CI50 tx individual), notoriamente OP fue el que más se benefició de la combinación de los tratamientos.

Por lo tanto, la combinación de OP de 1-10 kDa con una Dox, presenta un efecto aditivo, donde ambos compuestos mostraron un mayor efecto antiproliferativo y aditivo al encontrarse en combinación, en una concentración menor.

Se ha reportado anteriormente que la combinación de pectina cítrica comercial modificada (Pectasol) y Doxorubicina, presentan sinergismo, siendo estudiada en células de cáncer de próstata. Este efecto sinérgico se presentó en la combinación de 3 mg/mL y 250 nM respectivamente, con una disminución en la proliferación celular a 28% en comparación con los tratamientos individuales 49 y 47% (Pectasol y Dox), lo cual indica que los valores de CI50 disminuyeron 1.5 veces (Tehrani *et al.*, 2012).

A su vez, las fracciones de pectina cítrica u oligosacáridos de pectina, han actuado sobre células cancerígenas al modular su quimio resistencia, promoviendo su sensibilidad a los fármacos de quimioterapias (Eliaz y Raz, 2019; Johnson *et al.*, 2007).

Se han reportado estudios donde las pectinas modificadas combinadas con fármacos utilizados en quimioterapias confieren sensibilidad a células cancerígenas y quimiorresistentes. Se sugiere que la resistencia a los fármacos puede surgir de la inhibición del transporte del fármaco y la señalización asociada al objetivo, escapando de la respuesta inmune y la muerte celular inducida por fármacos, así como la formación y el mantenimiento de células tolerantes a los fármacos (Li *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2021; Marusyk *et al.*, 2020). El desarrollo de la resistencia a los medicamentos implica una reprogramación generalizada de la expresión génica, y la creciente evidencia demuestra que la regulación epigenética es uno de los procesos fundamentales que impulsan la resistencia a los medicamentos tanto inherente como adquirida en el CCR (cáncer colorrectal), y otros tipos de cánceres, aun así, los mecanismos que impulsan la resistencia son complejos y no están bien establecidos (Walker, 2016).

En base a la capacidad de las fracciones de OP para sensibilizar células cancerígenas, se ha reportado que la pectina modificada puede aumentar la apoptosis en células tumorales resistentes a fármacos. Por ejemplo, GCS-100, una pectina cítrica modificada (PCM) comercial, supera la resistencia a bortezomib y mejora la apoptosis inducida por dexametasona en células de mieloma múltiple (Chauhan *et al.*, 2005). Debido a que la pectina modificada aumentó significativamente la sensibilidad celular a los medicamentos de quimioterapia, se ha considerado aplicar un protocolo de combinación de pectina modificada y medicamentos de quimioterapia, pudiendo ser benéfico para el pronóstico de la enfermedad (Hosseini *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

En un estudio por Lu et al. (2013), se concluyó que la combinación de pectina cítrica de bajo peso molecular con Oxaliplatino pudo mejorar la capacidad del oxaliplatino para inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis, lo que puede estar asociado con la activación de la vía de la apoptosis mitocondrial.

La sensibilización de las células tumorales a los fármacos de quimioterapia se correlaciona con la inhibición de Gal-3 por pectinas modificadas. Una hipótesis sugiere que los inhibidores de Gal-3 pueden revertir la resistencia a los fármacos de las células tumorales debido a la participación de Gal-3 en la resistencia a la apoptosis y al mantenimiento de la resistencia a los fármacos (Fukumori *et al.*, 2007).

Otro modelo sugiere que Gal-3 interfiere con las interacciones entre el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL, por sus siglas en inglés) y sus receptores DR4 y DR5, que socavan la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés). Teniendo en cuenta que DR4 y DR5 se expresan en la superficie celular, posiblemente las pectinas modificadas se unan a Gal-3 extracelular, eliminando la interferencia de Gal-3 con TRAIL y DR4/DR5, transformando así las células tumorales resistentes a fármacos a sensibles a fármacos. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que MP (pectina modificada), MP ingrese al citoplasma para inhibir la Gal-3 intracelular (Ilmer *et al.*, 2016; Mazurek *et al.*, 2012). El interés principal en inhibir este receptor se relaciona a su alta presencia y sobreexpresión en distintos tipos de cánceres y estadios celulares, ya que este promueve el desarrollo, crecimiento y proliferación celular, la migración celular a otros tejidos y metástasis (Ahmed y Alsadek, 2015; Dong *et al.*, 2018; Takenaka *et al.*, 2002).

En relación con la interacción con los oligosacáridos de pectina o cadenas de pectina y su posible inhibición del receptor Gal-3, se ha reportado que la pectina modificada puede ser transportada al interior de la célula por Gal-3 u otros receptores dependiendo de la línea celular. Esta interacción se relacionó a la estructura química de pectinas modificadas donde su mayor componente de monosacárido es galactosa y ácido galacturónico provenientes de la cadena central de la pectina HG (homogalacturonanos), además de la región RG-1, siendo que los galactanos de cadena corta han presentado mayor afinidad a Gal-3, también arabinosa puede llevar a cabo una interacción con Gal-3 en conjunto con galactosa (Gao *et al.*, 2013; Mallikarjuna y Dharmesh, 2018; Zhang *et al.*, 2015).

Con base a los receptores de membrana presentes en Caco2 y las posibles interacciones con los

OP, recordemos que la presencia de los distintos receptores celulares de transporte de azúcares en Caco2 puede guiarnos en identificar las posibles interacciones de los oligosacáridos de pectina y Caco2. Recordando que en células cancerígenas hay una sobreexpresión de estos receptores y transportadores de azúcares en la membrana celular, por lo que la célula cancerígena presenta una mayor recepción de azúcares presentes en la matriz extracelular y por consiguiente mayor uso de estos para mantener su desarrollo celular. Esta capacidad les confiere una mayor adaptabilidad a ambientes con alto contenido de azúcares. De acuerdo con la composición de monosacáridos de nuestras OP, hay un contenido considerable de glucosa en su estructura, aunque no podemos definir si este se encuentra libre u unido a la cadena de los OP, se puede relacionar con que la proliferación de Caco2 no se ve afectada significativamente estando en exposición con los OP de 1-10 y >10 kDa, y con la capacidad de las células cancerígenas de utilizar mayor contenido de glucosa para su proliferación celular.

Por lo contrario, la combinación de Doxorubicina con la fracción de OP de 1-10 kDa si presentó efecto antiproliferativo. En base a esta combinación se realizó el Cuadro 6, donde se presenta la relación de las concentraciones utilizadas con el número de moléculas equivalentes tanto de Doxorubicina como de las fracciones de OP, esto para mostrar el contenido de moléculas que se encuentran tanto extracelular como intracelular en los cultivos de Caco2 durante los experimentales. Se omitió el número de moléculas correspondientes al OP >10 kDa ya que su contenido de moléculas es igual o menor al del contenido de la fracción de 1-10 kDa.

Cuadro 6. Relación entre concentraciones con moléculas de Dox y OP por célula.

Conc. Dox (µg/mL)	57.89	28.95	14.48	7.24
# Moléculas DOX x Célula	3.011×10^{15}	1.5055×10^{15}	7.5275×10^{14}	3.7636×10^{14}
Conc. OP <1 kDa (µg/mL)	1000	500	250	125
# Moléculas OP x Célula	3.104×10^{13}	1.552×10^{13}	7.76×10^{12}	3.88×10^{12}
Conc. OP 1-10kDa (µg/mL)	1000	500	250	125
# Moléculas OP x Célula	3.104×10^{12}	1.552×10^{12}	7.76×10^{11}	3.88×10^{11}

Recordando que la combinación de Dox + OP de 1-10 kDa presentó efecto aditivo, y que las CI50 de la combinación de Dox y del OP de 1-10 kDa fue de 15.86 y 272.53 µg/mL respectivamente,

esto correspondería a aproximadamente 1.5055×10^{18} y 1.552×10^{16} . Si dividimos este número de moléculas en el contenido de células por pozo que fue de 20,000 en teoría, cada célula estaría expuesta a 7.5275×10^{13} y a 7.76×10^{11} moléculas, respectivamente. Esta información nos dice que respecto al número de moléculas, doxorubicina es el que se encuentra en mayor cantidad que los oligosacáridos de pectina, sin embargo, estructuralmente los OP de 1-10kDa tienen mayor tamaño y complejidad, esto último por su composición química (AcGal: 73.2, Ram:6.49, Ara: 9.27, Xil: 0.43, Man: 5.49, Gal: 8.77, Glu: 10.5 g/100mg), aunque su contenido de ácido galacturónico es alto, las posibles combinaciones en la disposición de las cadenas de los oligosacáridos es lo que le brinda una gran cantidad de interacciones químicas dentro y fuera de la célula. Para conocer más a detalle esto último se requieren análisis adicionales, como la resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar el acomodo estructural, y SEC-MALLS para conocer a más detalle los pesos moleculares presentes en los OP.

Como recopilación de la discusión de resultados, las fracciones de oligosacáridos de pectina tienen un potencial en actuar sobre células cancerígenas para inducir apoptosis, inhibir la metástasis, y un importante efecto como adyuvante en quimioterapias. Los datos experimentales de modelos animales y modelos *in vitro* sugieren que la pectina modificada, incluidos los oligosacáridos de pectina, pueden reducir el tamaño de tumores sólidos. Sin embargo, algunos otros informes sugieren que las pectinas modificadas no muestran citotoxicidad hacia células tumorales y normales, y no inducen inhibición en el crecimiento de estos. El hecho de que algunas pectinas modificadas puedan inhibir células tumorales depende del origen de la célula tumoral o de la biodistribución de los fragmentos de pectina (Ferreira-Lazarte *et al.*, 2021; Kapoor y Dharmesh, 2017; Pedrosa *et al.*, 2020).

7. CONCLUSIONES

La hidrólisis hidrotérmica de la pectina permite obtener fracciones de bajo peso molecular de este polisacárido las cuales presentan un contenido homogéneo en su composición de monosacáridos y un alto contenido de ácido galacturónico. Los OP obtenidos no presentan un contenido alto de ácido ferúlico, pero tienen el potencial de actuar como antioxidantes sobre radicales libres. Sin embargo, se requieren métodos directos para conocer si los OP son antioxidantes en un sistema biológico o a nivel celular.

El rango de peso molecular de los oligosacáridos de pectina (OP) sí influye en el efecto antiproliferativo sobre la línea celular de adenocarcinoma colorrectal de humano (Caco2), siendo la fracción de menor peso molecular (< 1kDa) la que presenta efecto antiproliferativo sobre Caco2. La combinación de Doxorubicina con OP presenta un efecto antiproliferativo, además de presentar aditividad con la combinación de la fracción de 1-10 kDa de OP con Doxorubicina de manera dosis dependiente, inhibiendo el crecimiento de la proliferación celular de Caco2 en un 50%. Esto indica que los OP pueden sensibilizar células cancerígenas lo cual favorecería su uso como adyuvantes en quimioterapias para mejorar el efecto por sí solo de los fármacos anticancerígenos e inducir muerte celular en células cancerígenas.

Los resultados indican que los OP son candidatos como adyuvantes en quimioterapias para mejorar o facilitar el efecto de los fármacos sobre las células cancerígenas. Será de relevancia conocer más a profundidad el efecto de esta combinación en un sistema biológico y estudiar más a detalle las posibles respuestas de éste.

8. REFERENCIAS

- American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2005-2020
- American Joint Committee on Cancer. Bone. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017: 471.
- ACS. (2020). Colorectal Cancer Facts and Figures 2020-2022. *American Cancer Society*, 66(11), 1–41. Retrieved from <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2020-2022.pdf>
- Ahmed, H., & Alsadek, D. M. M. (2015). Galectin-3 as a potential target to prevent cancer metastasis. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 9, 113–121. <https://doi.org/10.4137/CMO.S29462>
- Ahn, S., Halake, K., & Lee, J. (2017). Antioxidant and ion-induced gelation functions of pectins enabled by polyphenol conjugation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 776–782. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.03.173>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell* (Sixth Edit). Garland Science.
- Alday, E., Valencia, D., Carreño, A. L., Picerno, P., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., ... Velazquez, C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.013>
- Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., ... Arnold, D. (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 31(10), 1291–1305. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683–691. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2015-310912>
- B. Gullón, B. Gómez, M. Martínez-Sabajanes, R. Yáñez, J. C. P. and J. L. A. (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties a n. *Elsevier*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.01.006>
- Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S., & Elst, K. (2016). Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), 594–606. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.996732>
- Banerjee, A., Pathak, S., Subramaniam, V. D., Dharamivasan, G., Murugesan, R., & Verma, R. S. (2017). Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. *Drug Discovery Today*, 22(8), 1224–1232. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.05.006>
- BeMiller, J. N. (2019). Oligosaccharides. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, 49–74.

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812069-9.00003-0>

- Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Alaiz, M., Vioque, J., Girón-Calle, J., & Fernández-Bolaños, J. (2019). Pectin-rich extracts from olives inhibit proliferation of Caco-2 and THP-1 cells. *Food and Function*, *10*(8), 4844–4853. <https://doi.org/10.1039/c9fo00917e>
- Bezerra, I. de L., Caillot, A. R. C., Palhares, L. C. G. F., Santana-Filho, A. P., Chavante, S. F., & Sasaki, G. L. (2018). Structural characterization of polysaccharides from Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc wines: Anti-inflammatory activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Carbohydrate Polymers*, *186*(October 2017), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.082>
- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J., & Stone, B. A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, *113*(2), 291–299. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)88244-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88244-5)
- Blanchard, H., Yu, X., Collins, P. M., & Bum-Erdene, K. (2014). Galectin-3 inhibitors: a patent review (2008–present). <Http://Dx.Doi.Org/10.1517/13543776.2014.947961>, *24*(10), 1053–1065. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.947961>
- Bonnin, E., Garnier, C., & Ralet, M. C. (2014). Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(2), 519–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5388-6>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burbano Luna, D. F., Manrique, M. A., Chávez García, M. Á., Pérez Corona, T., Hernández Velázquez, N. N., Escandón Espinoza, Y. M., ... Cerna Cardona, J. (2016). Epidemiología del cáncer colorrectal en menores de 50 años en el Hospital Juárez de México. *Endoscopia*, *28*(4), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.endomx.2016.10.008>
- Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J. A., Micard, V., León, N. P. de, & Gardea, A. (2007). Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*, *69*(2), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.10.006>
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, *161*, 118–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>
- Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Neri, P., He, D., ... Anderson, K. C. (2005). A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Research*, *65*(18), 8350–8358. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0163>
- Chen, L. Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W., & Frommer, W. B. (2015). Transport of sugars. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(February), 865–894. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033904>
- Chen, X., Qi, Y., Zhu, C., & Wang, Q. (2019). Effect of ultrasound on the properties and antioxidant activity of hawthorn pectin. *International Journal of Biological Macromolecules*,

131, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.077>

- Chen, Y., Wang, Y., Xu, L., Jia, Y., Xue, Z., Zhang, M., ... Chen, H. (2020). Ultrasound-assisted modified pectin from unripe fruit pomace of raspberry (*Rubus chingii* Hu): Structural characterization and antioxidant activities. *LWT*, *134*, 110007. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110007>
- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Quiévy, N., Danthine, S., Goffin, D., Jacquet, N., ... Paquot, M. (2013). Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *52*(1), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.006>
- Concha Olmos, J., & Zúñiga Hansen, M. E. (2012). Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates. *Chemical Engineering Journal*, *192*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.03.085>
- Davies, K. J. A., & Doroshov, J. H. (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(7), 3060–3067. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)35746-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)35746-0)
- de Moura, F. A., Macagnan, F. T., & da Silva, L. P. (2015, February 1). Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 50, pp. 275–281. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12681>
- do Nascimento, R. S., Pedrosa, L. de F., Diethelm, L. T. H., Souza, T., Shiga, T. M., & Fabi, J. P. (2020). The purification of pectin from commercial fruit flours results in a jaboticaba fraction that inhibits galectin-3 and colon cancer cell growth. *Food Research International*, *137*(September). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109747>
- do Prado, S., Misuzu, T., Harazono, Y., Hogan, V. A., Raz, A., Carpita, N. C., & Paulo, J. (2019). *Migration and proliferation of cancer cells in culture are differentially affected by molecular size of modified citrus pectin*. *211*(July 2018), 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.010>
- Dong, R., Zhang, M., Hu, Q., Zheng, S., Soh, A., Zheng, Y., & Yuan, H. (2018). Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *41*(2), 599–614. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3311>
- Dranca, F., & Oroian, M. (2018). Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Research International*, *113*(February), 327–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>
- Eliaz, I., & Raz, A. (2019). Pleiotropic effects of modified citrus pectin. *Nutrients*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/NU11112619>
- Fang, H. Y., Chen, Y. K., Chen, H. H., Lin, S. Y., & Fang, Y. T. (2012). Immunomodulatory effects of feruloylated oligosaccharides from rice bran. *Food Chemistry*, *134*(2), 836–840. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.190>
- Ferreira-Lazarte, A., Fernández, J., Gallego-Lobillo, P., Villar, C. J., Lombó, F., Moreno, F. J., & Villamiel, M. (2021). Behaviour of citrus pectin and modified citrus pectin in an azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS)-induced rat colorectal carcinogenesis

- model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1349–1360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.089>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2011.01.008>
- Flutto, L. (2003). Pectin. In D. L Flutto (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 4440–4449). Elsevier Science Ltd.
- Fortuna-Costa, A., Gomes, A. M., Kozłowski, E. O., Stelling, M. P., & Pavão, M. S. G. (2014). Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Frontiers in Oncology*, 4 JUN(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00138>
- Fukumori, T., Kanayama, H. omi, & Raz, A. (2007). The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 10(3), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.04.001>
- Gao, X., Zhi, Y., Sun, L., Peng, X., Zhang, T., Xue, H., ... Zhou, Y. (2013). The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng Pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33953–33965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482315>
- Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/polym10070762>
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2014). Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9769–9782. <https://doi.org/10.1021/jf503475b>
- Gómez, B., Míguez, B., Yáñez, R., & Alonso, J. L. (2017). Extraction of Oligosaccharides With Prebiotic Properties From Agro-Industrial Wastes. In *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00005-X>
- Guo, G. F., Cai, Y. C., Zhang, B., Xu, R. H., Qiu, H. J., Xia, L. P., ... Wang, F. (2011). Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Medical Oncology*, 28(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1007/S12032-010-9696-8>
- Holck, J., Hotchkiss, A. T., Meyer, A. S., Mikkelsen, J. D., & Rastall, R. A. (2014). Production and Bioactivity of Pectic Oligosaccharides from Fruit and Vegetable Biomass. *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, 9781118426, 76–87. <https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch5>
- Holck, J., Lorentzen, A., Vignæs, L. K., Licht, T. R., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). *Feruloylated and Nonferuloylated Arabino-oligosaccharides from Sugar Beet Pectin Selectively Stimulate the Growth of Bifidobacterium spp . in Human Fecal in Vitro Fermentations*. 6511–6519.
- Hosseini, G., Keshavarz, M., Ahmadi, S., & Naderi, N. (2013). *Synergistic Effects of PectaSol-C*

Modified Citrus Pectin an Inhibitor of Synergistic Effects of PectaSol-C Modified Citrus Pectin an Inhibitor of Galectin-3 and Paclitaxel on Apoptosis of Human SKOV-3 Ovarian Cancer Cells. (July 2014). <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.12.7561>

- Huang, R. Y., Pei, L., Liu, Q., Chen, S., Dou, H., Shu, G., ... Fu, H. (2019). Isobologram analysis: A comprehensive review of methodology and current research. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01222>
- Huang, X., Yang, Y., Liu, Q., & He, W. Q. (2020). Effect of high pressure homogenization on sugar beet pulp: Physicochemical, thermal and structural properties. *Lwt*, *134*(July), 110177. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110177>
- Ilmer, M., Mazurek, N., Byrd, J. C., Ramirez, K., Hafley, M., Alt, E., ... Bresalier, R. S. (2016). Cell surface galectin-3 defines a subset of chemoresistant gastrointestinal tumor-initiating cancer cells with heightened stem cell characteristics. *Cell Death and Disease*, *7*(8), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.239>
- Instituto Nacional de Cancerología, & Instituto Nacional de Salud Pública. (2015). *Colon Recto*. 800. Retrieved from <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>
- Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., ... Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, *17*(8), 805–819. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm054>
- Jeon, C., Kang, S., Park, S., Lim, K., Hwang, K. W., & Min, H. (2011). T cell stimulatory effects of Korean red ginseng through modulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Ginseng Research*, *35*(4), 462–470. <https://doi.org/10.5142/jgr.2011.35.4.462>
- Johnson, K. D., Glinskii, O. V., Mossine, V. V., Turk, J. R., Mawhinney, T. P., Anthony, D. C., ... Glinsky, V. V. (2007). Galectin-3 as a Potential Therapeutic Target in Tumors Arising from Malignant Endothelia. *Neoplasia*, *9*(8), 662–670. <https://doi.org/10.1593/NEO.07433>
- Kapoor, S., & Dharmesh, S. M. (2017). Pectic Oligosaccharide from tomato exhibiting anticancer potential on a gastric cancer cell line: Structure-function relationship. *Carbohydrate Polymers*, *160*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.046>
- Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2016). Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, Properties, And potential applications: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, *90*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *125*, 73–120. <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2021.01.003>
- Koepsell, H. (2017). The Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 are targets for the treatment of diabetes and cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, *170*, 148–165. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.017>
- Kothari, D., Patel, S., & Goyal, A. (2014). Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: Overview of current state and prospect. *Journal of Food Science*, *79*(8), 1491–1498. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12536>

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lara-Espinoza, C., Carvajal-Millán, E., Baladrán-Quintana, R., López-Franco, Y., & Rascón-Chu, A. (2018). Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040942>
- Leclere, L., Cutsem, P. Van, & Michiels, C. (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, 4 OCT(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00128>
- Leclere, L., Fransolet, M., Cote, F., Cambier, P., Arnould, T., Van Cutsem, P., & Michiels, C. (2015). Heat-modified citrus pectin induces apoptosis-like cell death and autophagy in HepG2 and A549 cancer cells. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115831>
- Li, B., Jiang, J., Assaraf, Y. G., Xiao, H., Chen, Z. S., & Huang, C. (2020). Surmounting cancer drug resistance: New insights from the perspective of N6-methyladenosine RNA modification. *Drug Resistance Updates*, 53, 100720. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2020.100720>
- Li, D.-Q., Li, J., Dong, H.-L., Li, X., Zhang, J.-Q., Ramaswamy, S., & Xu, F. (2021). Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088>
- Li, D., Jia, X., Wei, Z., & Liu, Z. (2012). Box – Behnken experimental design for investigation of microwave-assisted extracted sugar beet pulp pectin. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.017>
- Li, D. Q., Du, G. M., Jing, W. W., Li, J. F., Yan, J. Y., & Liu, Z. Y. (2015). Combined effects of independent variables on yield and protein content of pectin extracted from sugar beet pulp by citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 129, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.058>
- Li, G., Sun, Y., Guo, W., & Yuan, L. (2018). Comparison of various pretreatment strategies and their effect on chemistry and structure of sugar beet pulp. *Journal of Cleaner Production*, 181, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.259>
- Liang, X. xia, Gao, Y. ying, Pan, Y., Zou, Y. feng, He, M., He, C. liang, ... Lv, C. (2019). Purification, chemical characterization and antioxidant activities of polysaccharides isolated from *Mycena dendrobii*. *Carbohydrate Polymers*, 203, 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.09.046>
- Liu, J., Bi, J., McClements, D. J., Liu, X., Yi, J., Lyu, J., ... Liu, D. (2020). Impacts of thermal and non-thermal processing on structure and functionality of pectin in fruit- and vegetable- based products: A review. *Carbohydrate Polymers*, 250(2), 116890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116890>
- Londoño, J. L. (n.d.). *Antioxidantes : importancia biológica y métodos para medir su actividad*. 129–162.

- Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota , bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Publishing Group*, (September). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>
- Lu, J., Li, J., Jin, R., Li, S., Yi, J., & Huang, J. (2019). Extraction and characterization of pectin from *Premna microphylla* Turcz leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, *131*, 323–328. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.056>
- Lu, W., Wang, F., & Liu, H. (2013). [Influence of oxaliplatin combined with LCP on proliferation and apoptosis of colon cancer cell line HT29]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi = Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, *16*(1), 84–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355248>
- Luo, M., Yang, X., Chen, H. N., Nice, E. C., & Huang, C. (2021). Drug resistance in colorectal cancer: An epigenetic overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1876*(2), 188623. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188623>
- Luo, S. jing, Chen, R. yun, Huang, L., Liang, R. hong, Liu, C. mei, & Chen, J. (2017). Investigation on the influence of pectin structures on the pasting properties of rice starch by multiple regression. *Food Hydrocolloids*, *63*, 580–584. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.016>
- Macarulla, T., Casado, E., Ramos, F. J., Valverde, C., & Tabernero, J. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in gastrointestinal cancer. *Onkologie*, *29*(3), 99–105. <https://doi.org/10.1159/000091013>
- Mallikarjuna, S. E., & Dharmesh, S. M. (2018). *Swallow root (Decalepis hamiltonii) pectic oligosaccharide (SRO1) induces cancer cell death via modulation of galectin-3 and survivin.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.053>
- Malunga, L. N., & Beta, T. (2015). Antioxidant capacity of water-extractable arabinoxylan from commercial barley, wheat, and wheat fractions. *Cereal Chemistry*, *92*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-11-13-0247-R>
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Rimac Brnčić, S. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science and Technology*, *76*(January), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>
- Marusyk, A., Janiszewska, M., & Polyak, K. (2020). Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell*, *37*(4), 471–484. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.03.007>
- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J., & Belshaw, N. J. (2015). Rhamnogalacturonan I containing homogalacturonan inhibits colon cancer cell proliferation by decreasing ICAM1 expression. *Carbohydrate Polymers*, *132*, 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.082>
- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J., & Belshaw, N. J. (2016). Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. *Carbohydrate Polymers*, *136*, 923–929. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.063>

- Mazurek, N., Byrd, J. C., Sun, Y., Hafley, M., Ramirez, K., Burks, J., & Bresalier, R. S. (2012). Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. *Cell Death and Differentiation*, *19*(3), 523–533. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.123>
- Mendez-encinas, M. A., Carvajal-millan, E., Rascón Chu, A., Alday, E., & Velazquez, C. (2019). Arabinoxylan-Based Particles : In Vitro Antioxidant. *MDPI*.
- Monsoor, M. A., Kalapathy, U., & Proctor, A. (2001). Improved method for determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 2756–2760. <https://doi.org/10.1021/jf0009448>
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., ... Sforza, S. (2016). Pectin content and composition from different food waste streams in memory of Anna Surribas, scientist and friend. *Food Chemistry*, *201*, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.012>
- Munarin, F., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *51*(4), 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>
- Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. *Carbohydrate Polymers*, *168*, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>
- Newlaczył, A. U., & Yu, L. (2011). Galectin-3 – A jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Letters*, *313*(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.003>
- Ogutu, F. O., & Mu, T. H. (2017). Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.08.014>
- Ohlmaier-Delgadillo, F., Carvajal-Millán, E., López-Franco, Y. L. ., Islas-Osuna, M. A. ., Micard, V. ., Antoine-Assor, C. ., & Rascón-Chu, A. (2021). *Ferulated Pectins and Ferulated Arabinoxylans Mixed Gel Electrospayed Microbeads*.
- Oosterveld, A., Grabber, J. H., Beldman, G., Ralph, J., & Voragen, A. G. J. (1997). Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydrate Research*, *300*(2), 179–181. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00041-4)
- Ou, J., & Sun, Z. (2014). Feruloylated oligosaccharides : Structure , metabolism and function. *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.028>
- Patova, O. A., Golovchenko, V. V., & Ovodov, Y. S. (2014). Pectic polysaccharides: Structure and properties. *Russian Chemical Bulletin*, *63*(9), 1901–1924. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0681-9>
- Pedrosa, L. de F., Lopes, R. G., & Fabi, J. P. (2020). The acid and neutral fractions of pectins isolated from ripe and overripe papayas differentially affect galectin-3 inhibition and colon

- cancer cell growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2681–2690. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.135>
- Peng, X. yan, Mu, T. hua, Zhang, M., Sun, H. nan, Chen, J. wang, & Yu, M. (2016). Effects of pH and high hydrostatic pressure on the structural and rheological properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 60, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.025>
- Peres Diaz, L. S., Schuman, M. L., Aisicovich, M., Toblli, J. E., Pirola, C. J., Landa, M. S., & García, S. I. (2020). Short-term doxorubicin cardiotoxic effects: involvement of cardiac Thyrotropin Releasing Hormone system. *Life Sciences*, 261(July), 118346. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118346>
- Prandi, B., Baldassarre, S., Babbar, N., Bancalari, E., Vandezande, P., Hermans, D., ... Sforza, S. (2018). Pectin oligosaccharides from sugar beet pulp: Molecular characterization and potential prebiotic activity. *Food and Function*, 9(3), 1557–1569. <https://doi.org/10.1039/c7fo01182b>
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., ... Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - A review. *Molecules*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>
- Rajagopalan, G., & Krishnan, C. (2019). Functional Oligosaccharides: Production and Action [Chapter]. *ACS Symposium Series*, 1329, 155–180. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1329.ch008>
- Rajulapati, V., Dhillon, A., & Goyal, A. (2021). Enzymatically produced pectic-oligosaccharides from fruit waste of Citrus reticulata (mandarin) peels display cytotoxicity against colon cancer cells. *Bioresource Technology Reports*, 15(June), 100740. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100740>
- Ramachandran, C., Wilk, B. J., Hotchkiss, A., Chau, H., Eliaz, I., & Melnick, S. J. (2011). Activation of Human T-Helper/Inducer Cell, T-Cytotoxic Cell, B-Cell, and Natural Killer (NK)-Cells and induction of Natural Killer Cell Activity against K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells with Modified Citrus Pectin. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-59>
- Remoroza, C., Buchholt, H. C., Gruppen, H., & Schols, H. A. (2014). Descriptive parameters for revealing substitution patterns of sugar beet pectins using pectolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 1205–1215. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.034>
- ROBERTA RE, NICOLETTA PELLEGRINI, ANNA PROTEGGENTE, ANANTH PANNALA, MIN YANG, A., & RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant Activity Applying and Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Elsevier*, 26(1999), 51.
- Rosa, N. N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., & Micard, V. (2013). Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 57(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.10.002>
- Ruoshi Zhang, Xin Wang, Na Fan, & Jing Li. (2021). Enhanced anticancer performances of doxorubicin loaded macro-mesoporous silica nanoparticles with host-metal-guest structure | Elsevier Enhanced Reader. Retrieved October 5, 2021, from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1387181120305898?token=C6F80D72628173CE>

48953BC0C4ED0C6F2124C1D4D6A290039A311859AE1BF1B431E3670A51996606295
F8F70CA1AE14C&originRegion=us-east-1&originCreation=20211005193712

- Sabater, C., Ferreira-Lazarte, A., Montilla, A., & Corzo, N. (2019). Enzymatic Production and Characterization of Pectic Oligosaccharides Derived from Citrus and Apple Pectins: A GC-MS Study Using Random Forests and Association Rule Learning [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(26), 7435–7447. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00930>
- Sato, N., Takano, Y., Mizuno, M., Nozaki, K., Umemura, S., Matsuzawa, T., ... Makishima, S. (2013). Production of feruloylated arabino-oligosaccharides (FA-AOs) from beet fiber by hydrothermal treatment. *Journal of Supercritical Fluids*, 79, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.012>
- Saulnier, L., & Thibault, J. F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 396–402. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<396::AID-JSFA262>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<396::AID-JSFA262>3.0.CO;2-B)
- Sociedad Mexicana de Oncología A.C. (2016). Prevención Y Diagnóstico Oportuno En Cáncer. *México*, 1–23.
- Sritharan, S., & Sivalingan, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin - ScienceDirect. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
- Stepien, M., Chajes, V., & Romieu, I. (2016). The role of diet in cancer: The epidemiologic link. *Salud Publica de Mexico*, 58(2), 261–273. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7795>
- Suganya, K. S. U., Govindaraju, K., Kumar, V. G., & Karthick, V. (2016). International Journal of Biological Macromolecules Pectin mediated gold nanoparticles induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1030–1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.086>
- Swennen, K., Courtin, C. M., Van Der Bruggen, B., Vandecasteele, C., & Delcour, J. A. (2005). Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. *Carbohydrate Polymers*, 62(3), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.001>
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). *Doxorubicin : an update on anticancer molecular action* ., 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- Takenaka, Y., Fukumori, T., & Raz, A. (2002). Galectin-3 and metastasis. *Glycoconjugate Journal*, 19(7–9), 543–549. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014084.01324.15>
- Tallarida, R. J. (2000). *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis* (Vol. 148).
- Tan, H., Chen, W., Liu, Q., Yang, G., & Li, K. (2018). Pectin oligosaccharides ameliorate colon cancer by regulating oxidative stress- and inflammation-activated signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01504>
- Tehrani, N., Sepehri, H., Mehdipour, P., Biramijamal, F., Hossein-Nezhad, A., Sarrafnejad, A., & Hajizadeh, E. (2012). Combination effect of PectaSol and Doxorubicin on viability, cell cycle arrest and apoptosis in DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines. *Cell Biology International*, 36(7), 601–610. <https://doi.org/10.1042/CBI20110309>

- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, *21*(7), 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0B013E32833FFB56>
- Tirado, L., & Mohar, A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 7).
- Vansteenkiste, E., Babot, C., Rouau, X., & Micard, V. (2004). Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, *18*(4), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.09.004>
- Varela-López, A., Battino, M., Navarro-Hortal, M. D., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Romero-Márquez, J. M., ... Quiles, J. L. (2019). An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food and Chemical Toxicology*, *134*(July), 110834. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110834>
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., ... Wichers, H. (2015). The Impact of Food Bioactives on Health. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
- Vladislav V. Glinskya and Avraham Raz. (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Walker, J. M. (2016). *Cancer Drug Resistance* (J. Rueff & A. S. Rodrigues, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3347-1>
- Wu, D., Zheng, J., Hu, W., Zheng, X., He, Q., Linhardt, R. J., ... Chen, S. (2020). Structure-activity relationship of Citrus segment membrane RG-I pectin against Galectin-3: The galactan is not the only important factor. *Carbohydrate Polymers*, *245*(May). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116526>
- Xiong, B., Zhang, W., Wu, Z., Liu, R., Yang, C., Hui, A., ... Xian, Z. (2021). Preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory activities of acid-soluble pectin from okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 824–834. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.202>
- Yeung, Y. K., Kang, Y. R., So, B. R., Jung, S. K., & Chang, Y. H. (2021). Structural, antioxidant, prebiotic and anti-inflammatory properties of pectic oligosaccharides hydrolyzed from okra pectin by Fenton reaction. *Food Hydrocolloids*, *118*(March), 106779. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106779>
- Zhang, T., Sun, G., Shuai, M., Ye, J., Huang, J., Yao, X., ... Min, X. (2021). Purification, chemical analysis and inhibitory effects on galectin-3 of enzymatic pH-modified citrus pectin. *Food Chemistry: X*, *12*, 100169. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2021.100169>
- Zhang, T., Wang, Z., Yu, S., Guo, X., Ai, C., Tang, X., ... Meng, H. (2021). Effects of pH and temperature on the structure, rheological and gel-forming properties of sugar beet pectins. *Food Hydrocolloids*, *116*(February), 106646. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106646>

- Zhang, W., Xu, P., & Zhang, H. (2015). Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 44(2), 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.001>
- Zhang, Z., Wang, X., Liu, C., & Li, J. (2016). The degradation, antioxidant and antimutagenic activity of the mucilage polysaccharide from *Dioscorea opposita*. *Carbohydrate Polymers*, 150, 227–231. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.034>
- Zhu, J., Zhang, D., Tang, H., & Zhao, G. (2018). Structure relationship of non-covalent interactions between phenolic acids and arabinan-rich pectic polysaccharides from rapeseed meal. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 2597–2603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.036>
- Zhu, R., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, L., Wang, C., Hu, F., ... Chen, G. (2019). Pectin oligosaccharides from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. major): Molecular characterization and potential antiglycation activities. *Food Chemistry*, 286(January), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.215>