

## Capítulo 12

# Potencial terapéutico de derivados de caña de azúcar en la regeneración de la piel: cultivo 2D

Mónica Cuellar Entrena, Laura Rueda Gensini, Juan Carlos Cruz Jiménez, Carolina Muñoz Camargo y Jader Rodríguez Cortina

## Resumen

Actualmente existe un interés creciente por el azúcar no centrifugada de caña, debido a su alto valor nutricional, riqueza en moléculas funcionales y potencial medicinal. Este estudio se enfocó en estudiar el efecto de derivados de caña de azúcar, específicamente a partir de extractos de jugo, miel y panela, sobre procesos regenerativos en un modelo de herida 2D *in vitro*. Todos los extractos mostraron una baja citotoxicidad en células vero dentro de un amplio rango de concentraciones (8-250 µg/mL) y una alta hemocompatibilidad, demostradas por una baja actividad hemolítica y trombogénica. La presencia de extractos de jugo, miel y panela en un cultivo 2D de queratinocitos y fibroblastos humanos, previamente modificado para simular una herida, aumentó la migración celular de manera significativa al ser comparados con el control, en ausencia de dichos compuestos, lo que reduce el tiempo necesario para el cierre completo de la herida en casi un 50 %.

**Palabras clave:** panela, evaluación *in vitro*, citotoxicidad, actividad hemolítica y trombogénica

## Introducción

El consumo de productos derivados de algunas plantas tropicales, como la caña de azúcar para la producción de panela (*Saccharum officinarum* L.), está fuertemente relacionado con beneficios para la salud, debido a su valor nutricional, riqueza de moléculas funcionales y potencial medicinal (Ames et al., 1993; Jaffé, 2015). Muchas plantas tropicales como esta se valoran por ser fuentes naturales de antioxidantes. Los antioxidantes son moléculas que controlan y reducen el daño oxidativo al retrasar o inhibir el proceso de oxidación generado por radicales libres, lo que mejora la vida útil de los productos y, simultáneamente, protege el sistema biológico de quien los consume (Duthie et al., 1996). En la última década, los compuestos fenólicos han ganado un considerable interés en el ámbito médico y científico debido a sus diferentes propiedades biológicas (Balasundram et al., 2006). Los compuestos antioxidantes, como el  $\beta$ -caroteno, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos, juegan un papel terapéutico y preventivo contra varias condiciones y enfermedades como el envejecimiento, la inflamación y ciertos tipos de cáncer (Heliövaara et al., 1994; Vivekananthan et al., 2003; Zidan & Azlan, 2022).

Por esto, el uso de plantas, productos y extractos derivados de estas ha sido una ruta para acelerar el proceso de cicatrización y regeneración de heridas (Reuter et al., 2010). En Colombia, por ejemplo, se usa como crema cicatrizante la ralladura de panela, pero esta práctica cultural se basa únicamente en la tradición y no cuenta con ningún tipo de evidencia científica sobre cuáles compuestos químicos tienen efecto cicatrizante o cuál es su mecanismo de acción. Sin embargo, la composición y las propiedades biológicas de interés de la caña de azúcar y sus derivados pueden verse afectadas por diferentes factores como la variedad (genotipo), el clima, los suelos, la nutrición del cultivo, el tiempo de cosecha, el almacenamiento y los procesos posteriores a la cosecha, corte, almacenamiento y procesamiento agroindustrial (Pérez-Gregorio et al., 2011; Rodrigues et al., 2009). Por tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial

terapéutico de tres extractos de derivados de caña de azúcar (jugo, miel y panela) producidos bajo condiciones controladas de temperatura, para preservar mejor su composición bioactiva. En particular, el potencial de estos derivados para promover procesos regenerativos en heridas de piel humana se evaluó mediante un modelo *in vitro* de herida 2D.

## Metodología

En el estudio, los derivados de caña de azúcar empleados y la nomenclatura para la identificación de las muestras (entre paréntesis) fueron los siguientes: jugo crudo (J), jugo clarificado (JC), jarabe (miel) y panela (panela). Para evaluar el potencial regenerativo de los derivados de caña de azúcar, se caracterizaron diferentes propiedades biológicas determinantes en los procesos de regeneración de heridas. Primero, se evaluó la citocompatibilidad de los extractos metanólicos de los derivados de caña con el propósito de determinar el rango de concentración viable para su subsecuente uso en el modelo de herida 2D *in vitro*.

## Preparación de muestras

Las muestras se prepararon a partir de 1.000 kg de caña de azúcar (variedad RD 7511): caña (18 °Bx), jugo (21 °Bx), miel (68 °Bx) y panela (93 °Bx), los cuales fueron producidos por AGROSAVIA empleando procesos de extracción, clarificación, evaporación y concentración bajo condiciones térmicas controladas. La extracción de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo con el protocolo de Duarte-Almeida et al. (2011), con algunas modificaciones. Se realizó la extracción en triplicado a partir de las muestras de derivados de caña liofilizadas (~30 g), con metanol al 100 %, en una proporción de 1:1 p/v. Las muestras fueron filtradas bajo vacío con papel filtro (Whatman n.º 1). El exceso de solvente fue removido a 37 °C y 100 rpm en un rotoevaporador durante 30 min. Posteriormente, las muestras fueron suspendidas en 60 mL de metanol al 100 %.

Se prepararon *stocks* de 10 mg/mL en *buffer* de Hepes de 10 mM para cada uno de los derivados de caña y el solvente de extracción (metanol), con el propósito de estimar su impacto en los ensayos *in vitro*. Se realizó la caracterización biológica de los extractos para determinar el rango de concentración viable para su subsecuente uso en el modelo de herida 2D *in vitro*. En particular, se evaluaron características que presentan especial interés dentro del marco de regeneración de piel en un modelo de herida 2D, como la citotoxicidad, la hemocompatibilidad y la actividad antibacteriana. Todas las concentraciones de los extractos metanólicos se prepararon en *buffer* de Hepes de 10 mM, a menos que se indique lo contrario.

### Citotoxicidad

Para evaluar la viabilidad celular de los diferentes extractos, se cultivaron células vero (ATCC CCL-81) en placas de 96 pozos a una densidad celular de 100.000 células por pozo. El cultivo fue expuesto durante 24 horas a 8 concentraciones diferentes de los derivados de caña (8-1.000 µg/mL), en condiciones controladas de temperatura a 37 °C y con una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez terminado el tiempo de incubación, se determinó la citotoxicidad *in vitro* mediante dos métodos: el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), para determinar el efecto de los extractos sobre la actividad metabólica celular, y la prueba de lactato deshidrogenasa (LDH), para evaluar su efecto sobre la integridad de la membrana celular.

Para el primero, las células se expusieron a bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y se incubaron durante 2 horas, en la oscuridad, a 37 °C. Finalmente, se disolvieron los cristales de formazán formados al adicionar 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 20 % (v/v). Se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Ames et al., 1993). Se utilizó el 10 % (v/v) de DMSO en el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) como control positivo, y el medio DMEM como control negativo. La viabilidad celular de MTT (%) se calculó de acuerdo con la ecuación 1,

donde  $A_E$  es la absorbancia del medio con un extracto específico,  $A_{B_E}$  es la absorbancia del blanco del extracto,  $A_{DMEM}$  es la absorbancia del control negativo y  $A_{B_{DMEM}}$  es la absorbancia del blanco del control negativo.

$$\% \text{ de viabilidad de MTT} = \frac{A_E - A_{B_E}}{A_{DMEM} - A_{B_{DMEM}}} * 100 \quad (1)$$

Para el ensayo LDH, se tomó una muestra de 50  $\mu$ L del sobrenadante del cultivo previo a la exposición a MTT y se pasó a una microplaca nueva. Las muestras fueron expuestas al sustrato de la enzima LDH de acuerdo con las especificaciones del kit de LDH de Sigma-Aldrich, y se leyó la absorbancia de la muestra a 490 nm en un espectrofotómetro. Se utilizó el 10 % (v/v) de Triton X-100 en el medio DMEM como control positivo, y el medio DMEM como control negativo. La viabilidad celular de LDH (%) se calculó de acuerdo con la ecuación 2, donde  $A_{triton}$  es la absorbancia del control positivo, y  $A_{B_{triton}}$  es la absorbancia del blanco del control positivo.

$$\% \text{ de viabilidad de LDH} = 1 - \frac{A_E - A_{B_E}}{A_{triton} - A_{B_{triton}}} * 100 \quad (2)$$

## Hemólisis

Se obtuvieron 5 mL de sangre de un donante humano sano en un tubo EDTA K2, para prevenir la coagulación de la muestra (Comité de ética de investigación acta N° 1095 del 2019). La muestra de sangre fue centrifugada a 1.800 rpm durante 5 min para separar los glóbulos rojos del plasma y los glóbulos blancos. Posteriormente, el plasma se removió de la muestra y se descartó. Las impurezas y trazas de plasma fueron removidas de los glóbulos rojos mediante tres lavados con centrifugación a 1.800 rpm por 5 min. Las células fueron lavadas con 150 mM de NaCl en una proporción de 1:1 (v/v). Los glóbulos rojos se expusieron a 8 concentraciones de extractos dentro del rango de 8-1.000  $\mu$ g/mL

en *buffer* de Hepes de 10 mM durante 1 hora a 37 °C. Se utilizaron 1X y Triton X-100 al 10 % (v/v) como control negativo y positivo, respectivamente. Se tomaron 100 µL de sobrenadante de cada muestra y se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (Evans et al., 2013). La capacidad hemolítica se cuantificó en relación con el control negativo, de acuerdo con la ecuación 3, donde  $A_{PBS}$  y  $A_{BPBS}$  son las absorbancias del control negativo y del blanco del control negativo, respectivamente.

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{A_E - A_{B_E}}{A_{PBS} - A_{B_{PBS}}} * 100 \quad (3)$$

### Agregación plaquetaria

Se obtuvo plasma rico en plaquetas de un donante humano sano en un tubo de citrato de sodio, para evitar la agregación de la muestra durante la donación. Para determinar si los extractos inducían agregación plaquetaria, el plasma rico en plaquetas fue subsecuentemente expuesto a 8 concentraciones de extractos dentro del rango de 8-1.000 µg/mL en *buffer* de Hepes de 10 mM. Se utilizaron tres controles para evaluar la agregación de las plaquetas: trombina (alta agregación), PBS (baja agregación) y plasma pobre en plaquetas (PPP; no agrega). Se cuantificó la agregación plaquetaria mediante absorbancia en relación con el control positivo, de acuerdo con la ecuación 4, donde  $A_{PPP}$  es la absorbancia del PPP, y  $A_{tromb}$  es la absorbancia de la trombina (Tsujino et al., 2019).

$$\% \text{ de agregación} = \frac{A_E - A_{PPP}}{A_{tromb} - A_{PPP}} * 100 \quad (4)$$

### Actividad antibacteriana

Se realizó una prueba piloto de actividad antibacteriana según las directrices del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

sobre el método de microdilución (Cockerill et al., 2011). Se preparó un inóculo de *Escherichia coli* estandarizado según densidad óptica a los 620 nm en un espectrofotómetro. Las bacterias fueron expuestas a dos concentraciones de cada extracto: alta (10 mg/mL) y baja (1 mg/mL), en medio Luria-Bertani (LB), por triplicado, en placas de 96 pozos. Con base en el ensayo de citotoxicidad (cinco concentraciones), se escogió la concentración más tóxica para las células (10 mg/mL) y una concentración intermedia-baja (1 mg/mL), con el fin de encontrar actividad antibacteriana en este rango y así identificar la acción potencial de algunos de los extractos de los derivados de caña de azúcar. Las bacterias se incubaron por 3 horas a 37 °C. Cumplido el tiempo de incubación, se reinició el crecimiento bacteriano con 100 µL de medio LB. Se utilizó *buffer* Hepes de 10 mM como control negativo y 1 mg/mL de ciprofloxacina (antibiótico) como control positivo. Las bacterias se incubaron una segunda vez durante 6 horas a 37 °C y se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro a 620 nm. Se cuantificó la actividad antibacteriana en relación con el control negativo, de acuerdo con la ecuación 5, donde  $A_E$  es la absorbancia del extracto,  $A_{BE}$  es la absorbancia del blanco del extracto,  $A_C$  es la absorbancia del control negativo y  $A_{BC}$  es la absorbancia del blanco del control negativo.

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{A_E - A_{BE}}{A_C - A_{BC}} * 100 \quad (5)$$

### Cultivo celular

Se cultivaron queratinocitos de piel humana (HaCaT donadas por el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes) y fibroblastos de prepucio humano (HFF-1 ATCC-SCRC-1041), de manera independiente, en frascos de 75 cm<sup>3</sup> (SPL Life Sciences). Las células fueron mantenidas con medio completo de DMEM suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células fueron desprendidas de las cajas con un 0,25 % de tripsina-EDTA. La densidad celular fue determinada

mediante el método de tinción con azul de tripán y conteo celular en cámara de Neubauer. Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> y un 95 % de humedad.

## Ensayo de herida 2D

El ensayo de herida 2D se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Liang et al. (2007), con algunas modificaciones. Se sembraron 200.000 células por pozo en una microplaca de 24 pozos. Una vez que las células llegaron al 70-80 % de confluencia, se procedió a realizar la herida en el centro de la monocapa celular con la punta de una micropipeta de 100 µL. La formación de la herida fue guiada por un molde para evitar variabilidad en la generación de la herida en todos los pozos (Suarez-Arnedo et al., 2020).

Una vez realizada la herida, se removió el medio de cultivo y se lavó con 1X para eliminar las células muertas y las trazas de la herida. Finalmente, se expuso cada pozo por triplicado a un tratamiento (250 µg/mL de caña, 250 µg/mL de jugo, 250 µg/mL de miel, 250 µg/mL de panela, un 0,25 % v/v de metanol, o DMEM). Las concentraciones de los diferentes derivados de la caña de azúcar fueron determinadas teniendo en cuenta un ensayo de citotoxicidad previo en el que se evaluaron cinco concentraciones y se determinó que 250 µg/mL era la concentración a la que ninguno de los derivados (caña, jugo, miel, panela y panela comercial) presentaba toxicidad en las mismas células utilizadas en el modelo de herida. Cada línea celular (HaCaT y HFF) fue cultivada por un total de 24 horas y evaluada de manera independiente.

La migración celular fue documentada con un microscopio invertido mediante el uso de imágenes tomadas a diferentes tiempos: inmediatamente después (t0), 12 horas después (t12) y 24 horas después (t24) de hacer la herida. Las imágenes de cada pozo fueron tomadas dentro de un mismo campo de visión y analizadas con el *software* ImageJ. La distancia de la herida

(ancho) fue medida utilizando una herramienta desarrollada por el Grupo de Ingeniería Biomédica (GIB) de la Universidad de los Andes (Suarez-Arnedo et al., 2020). Todos los tratamientos y el control fueron realizados por triplicado, evaluando tres campos por cada pozo ( $n=9$ ). La tasa de migración celular ( $R_m$ ) (ecuación 6) y el ancho de la herida fueron determinados utilizando la fórmula descrita por Grada et al. (2017), donde  $D_i$  es el ancho de la herida en el tiempo inicial,  $D_f$  es el ancho de la herida en el tiempo final y  $t$  es el tiempo transcurrido.

$$R_m = \frac{D_i - D_f}{t} \quad (6)$$

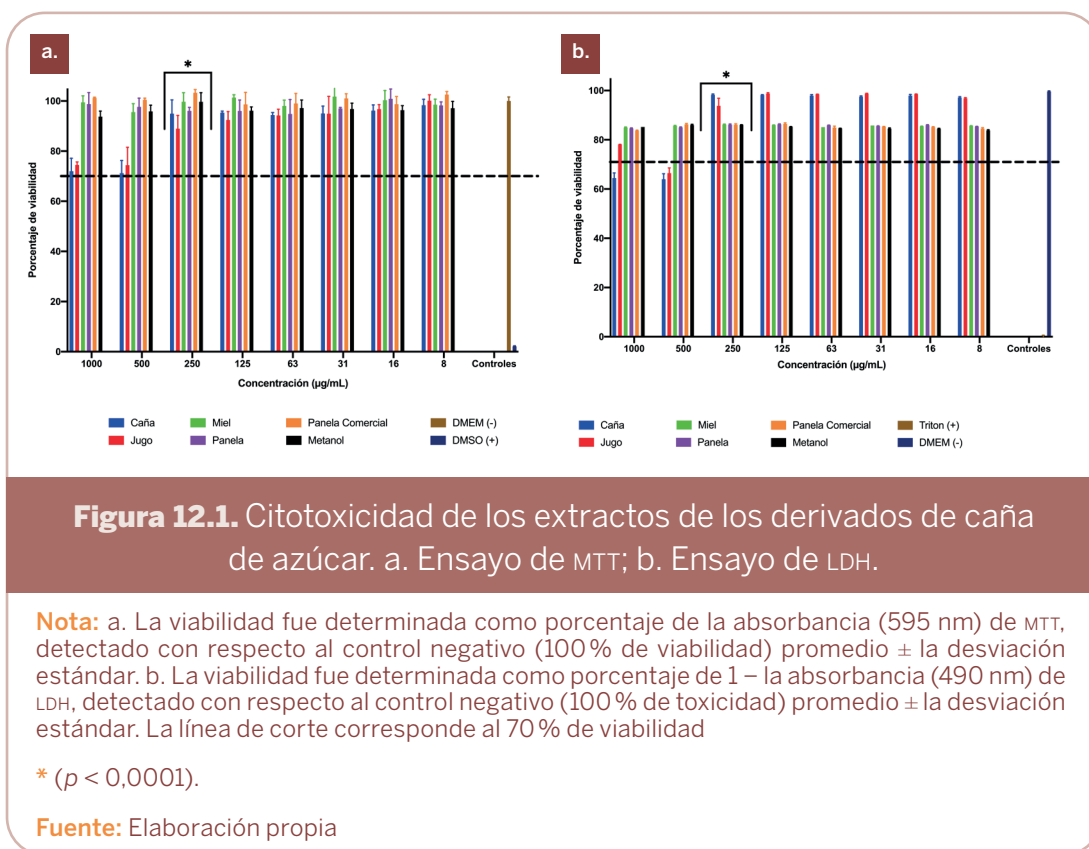
### Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y cada medida se realizó tres veces en cada réplica ( $n=9$ ). Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. La diferencia entre medias se evaluó mediante un análisis de varianza unifactorial (ANOVA). Los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos fueron comparados con respecto al control mediante t-test, utilizando GraphPad Prism 8. Se consideraron diferencias significativas entre medidas de los grupos experimentales si  $p < 0,05$  y  $p < 0,0001$  al ser comparados con el grupo de control.

## Resultados y discusión

### Propiedades biológicas de los extractos derivados de caña panelera

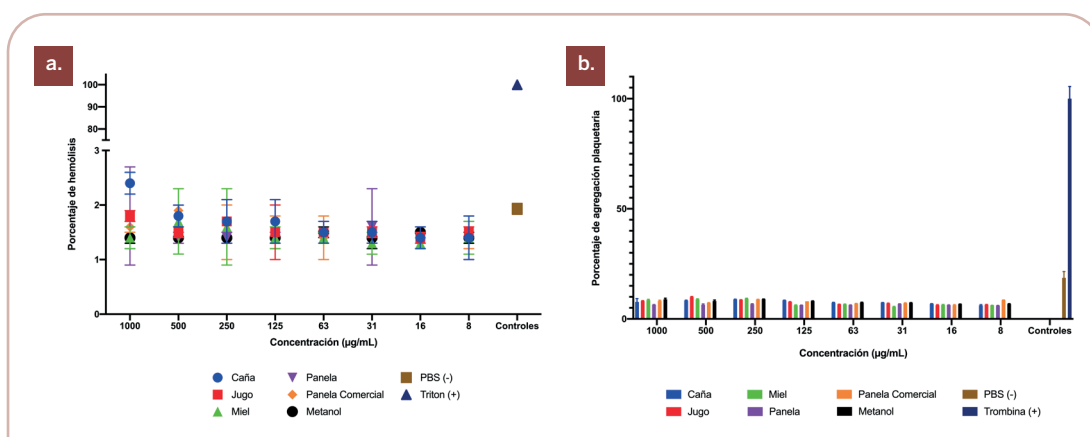
La actividad metabólica de las muestras se evaluó por medio de un ensayo de MTT, y la integridad de la pared celular fue determinada mediante un ensayo de LDH. Los resultados de ambos ensayos demostraron que el rango de concentración de los extractos en el cual se mantiene la viabilidad celular es bastante amplio (figura 12.1).



La caña y el jugo fueron los únicos extractos que presentaron una reducción significativa en la viabilidad celular para las concentraciones más altas evaluadas (1 mg/mL y 500  $\mu$ g/mL). Como se observa en la figura 12.1, todas las concentraciones de miel y panela presentan una viabilidad superior al 70 % (el mínimo permitido por la norma ISO 10993-5:2009). Además, con el propósito de evidenciar el posible efecto adverso de trazas de metanol en las muestras, se utilizaron 8 concentraciones de metanol en DMEM, como control del contenido de solvente en cada dilución, donde el máximo es el 0,25 % v/v, y se realizaron diluciones de 1:2 hasta el 0,00195 % v/v. Los resultados presentados en la figura 12.1 evidencian que la máxima concentración posible en las diluciones de extractos no presenta ningún efecto adverso ni reduce la respuesta generada por cada concentración evaluada. De acuerdo con estos resultados, se propone utilizar concentraciones de los extractos iguales o menores a 250  $\mu$ g/mL para estudios subsecuentes.

Como el contacto con la sangre es inevitable en cualquier tratamiento sobre una herida, se evaluaron los efectos de los extractos sobre dos componentes principales de la sangre: el plasma (plaquetas) y los eritrocitos. Los resultados evidenciados en la figura 12.2 demuestran que ninguno de los extractos de caña evaluados presenta características incompatibles con la sangre.

En la figura 12.2a se observa que los extractos derivados de caña de azúcar para panela evaluados no inducen más de un 3% de destrucción de los glóbulos rojos (hemólisis). Adicionalmente, en la figura 12.2b es evidente que ninguno de los extractos derivados de caña de azúcar para panela presenta una agregación plaquetaria superior al 10%. Dicha agregación no es significativa en relación con el control positivo de trombina. Estos resultados sugieren que la exposición de una herida a estos extractos derivados de caña de azúcar no traerá efectos adversos relacionados a toxicidad sanguínea o trombogénesis.

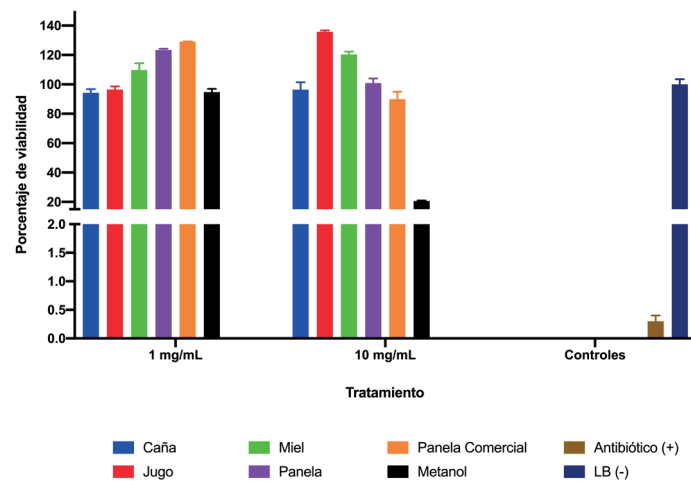


**Figura 12.2.** Hemocompatibilidad de los extractos de los derivados de caña de azúcar. a. Ensayo de hemólisis; b. Ensayo de agregación plaquetaria.

**Nota:** a. Exposición de eritrocitos ( $4,68 \times 10^6$  glóbulos rojos/L) a 8 concentraciones de los extractos de caña. Se evalúa lisis celular mediante absorbancia (595 nm) de las muestras en relación con el control positivo (Triton X-100 al 10%). El control positivo fue tomado como el 100% de lisis. b. Porcentaje de agregación plaquetaria relativo al control positivo de trombina, donde se determina el efecto de la trombina como el 100% de la capacidad de agregación de plaquetas. Todos los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

Por otro lado, para determinar el efecto que podrían tener los extractos sobre el control de infecciones en heridas, se evaluó su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, de acuerdo con los resultados resumidos en la figura 12.3, los extractos no presentan actividad antibacteriana de manera significativa al ser comparados con el control, ya que no hubo una inhibición significativa en el crecimiento bacteriano.



**Figura 12.3.** Actividad antibacteriana de los extractos de los derivados de caña de azúcar.

**Nota:** La viabilidad bacteriana fue evidenciada en términos de la inhibición en el crecimiento, la cual fue determinada mediante la absorbancia de la muestra (620 nm), donde mayor absorbancia corresponde a mayor crecimiento bacteriano y, como consecuencia, a mayor viabilidad.

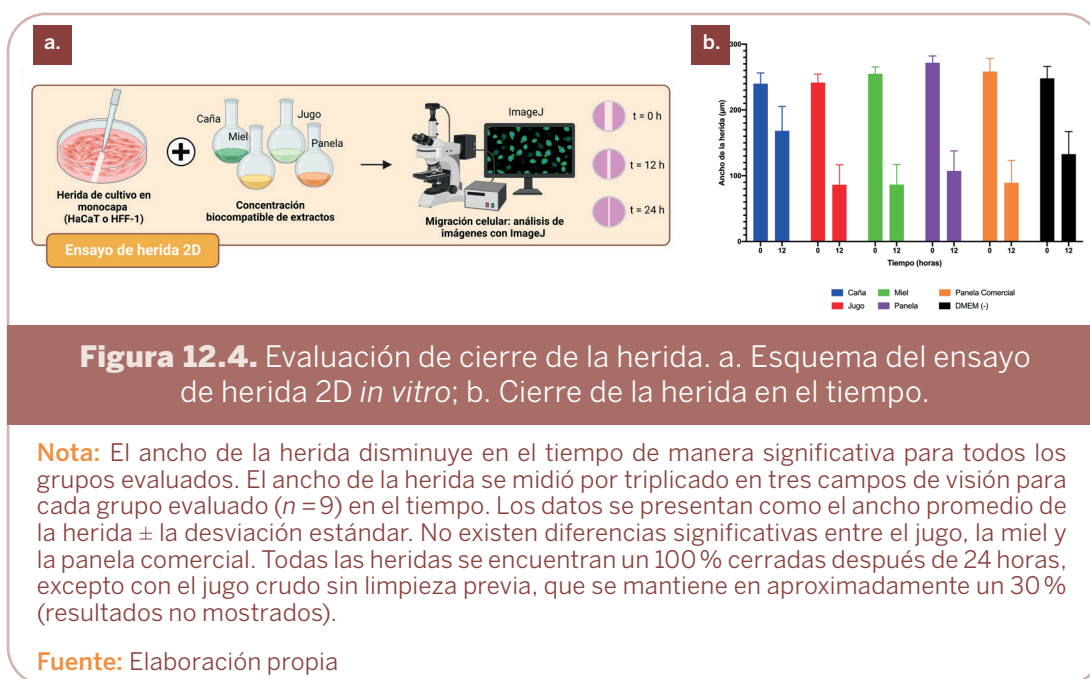
**Fuente:** Elaboración propia

## Ensayo de herida 2D

Los resultados de migración celular para el cierre de herida se determinaron de manera cuantitativa, de acuerdo con el protocolo descrito previamente e ilustrado en la figura 12.4a. En la figura 12.4b se observa el cambio en el ancho de la herida en el tiempo tras su exposición a los diferentes tratamientos de los productos derivados de la caña de azúcar. Todos los extractos presentaron diferencias significativas al ser comparados con el control (medio de cultivo DMEM).

Se evidenció que la tasa de migración celular ( $R_m$ ) aumentó en un 35, 46 y 43% para los extractos de jugo, miel y panela, respectivamente, en comparación con la tasa de migración del control.

Estos resultados indican que los extractos retienen compuestos con un alto potencial regenerativo. Debido a que no se evidenciaron diferencias significativas entre los efectos generados por estos tres derivados de caña de azúcar para producción de panela, se plantea la hipótesis de que la/s molécula/s responsable/s de dicho efecto no varía/n significativamente durante la concentración a lo largo de la cadena de producción de los derivados de caña panelera evaluados. Sin embargo, el extracto de caña es el único que presentó el efecto contrario al esperado. La tasa de migración celular para este extracto es un 38% menor a la evidenciada con el control. Lo anterior indica que existe algún compuesto o conjunto de compuestos presentes en el bagazo de la caña de azúcar que reduce de manera significativa la migración celular *in vitro*. Se plantea la hipótesis de que dicho/s compuestos está/n presente/s en el bagazo debido a que este es removido en la etapa de producción de jugo de caña.



## Conclusiones

Los extractos aislados a partir de derivados de caña de azúcar mediante el método de extracción con metanol pueden ser empleados en ensayos *in vitro* en un amplio rango de concentraciones, que van desde 8 hasta 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto se evidenció a través de ensayos de biocompatibilidad celular que demostraron que concentraciones iguales o inferiores a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no presentan citotoxicidad. Adicionalmente, ninguna de las concentraciones evaluadas tiene la capacidad de inducir hemólisis o agregación plaquetaria de manera significativa, lo cual asegura que los extractos no inducirán efectos adversos relacionados con su contacto con sangre en el microambiente de la herida. Por otro lado, los extractos metanólicos evaluados no presentan un potencial efecto antibacteriano en los rangos de concentración evaluados, por lo que se descarta que su efecto regenerativo se deba al control de infecciones. A pesar de esto, los extractos metanólicos de derivados de caña panelera favorecen la migración celular en heridas 2D modeladas por el cultivo en monocapa de queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos humanos (HFF-1). El jugo, la miel y la panela aumentan la migración celular de manera significativa al ser comparados con el control, por lo que reducen el tiempo necesario para el cierre completo de la herida en casi un 50%. De manera global, se evidencia el gran potencial terapéutico y regenerativo de los extractos metanólicos aislados a partir de los derivados de caña para producción de panela.

## Agradecimientos

Agradecemos a AGROSAVIA por el apoyo financiero y al equipo de investigación del proyecto “Desarrollo de procesos industriales que permitan obtener productos de valor agregado derivados de caña de azúcar para la producción de panela” por el desarrollo del estudio.

## Referencias

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7.915-7.922. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.90.17.7915>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Cockerill, F. R., Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., & Zimmer, B. L. (2011). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Duarte-Almeida, J. M., Salatino, A., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry*, 125(2), 660-664. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.059>
- Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A., & Collins, A. R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56(6), 1.291-1.295. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8640816/>
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., Nelson, H. M., Giorgio, T. D., & Duvall, C. L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, (73), artículo e50166. <https://doi.org/10.3791/50166>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Heliövaara, M., Knekt, P., Aho, K., Aaran, R. K., Alfthan, G., & Aromaa, A. (1994). Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53(1), 51-53. <https://doi.org/10.1136/ard.53.1.51>
- Jaffé, W. R. (2015). Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature.

- Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.06.007>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). *In vitro* scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2(2), 329-333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Pérez-Gregorio, M. R., Regueiro, J., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2011). Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control*, 22(7), 1.108-1.113. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.006>
- Reuter, J., Merfort, I., & Schempp, C. M. (2010). Botanicals in dermatology: An evidence-based review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 11(4), 247-267. <https://doi.org/10.2165/11533220-000000000-00000>
- Rodrigues, A. S., Pérez-Gregorio, M. R., García-Falcón, M. S., & Simal-Gándara, J. (2009). Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs. *Food Research International*, 42(9), 1.331-1.336. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.005>
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of *in vitro* scratch wound healing assays. *PLOS ONE*, 15(7), artículo e0232565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>
- Tsujino, T., Isobe, K., Kawabata, H., Aizawa, H., Yamaguchi, S., Kitamura, Y., Masuki, H., Watanabe, T., Okudera, H., Nakata, K., & Kawase, T. (2019). Spectrophotometric determination of the aggregation activity of platelets in platelet-rich plasma for better quality control. *Dentistry Journal*, 7(2), artículo 61. <https://doi.org/10.3390%2Fdj7020061>
- Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., Hsu, A., & Topol, E. J. (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, 361(9.374), 2.017-2.023. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13637-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13637-9)
- Zidan, D., & Azlan, A. (2022). Non-centrifugal sugar (NCS) and health: A review on functional components and health benefits. *Applied Sciences*, 12(1), artículo 460. <https://doi.org/10.3390/app12010460>