

**Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad biológica *In vitro* en astrocitos de cultivo primario**

**Autor:**

**Mitchell Martí Ariza**

**Pontificia Universidad Javeriana.**

**Carrera 7 N° 40-62.**

**Tel: (571) 3208320.**

**Bogotá D.C. 2011**

Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad biológica *In vitro* en astrocitos de cultivo primario

Autor:

Mitchell Martí Ariza

---

Ingrid Schuler Ph. D  
Bióloga  
Decana académica

---

Andrea Forero  
Bióloga  
Directora de Carrera de Biología

Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad biológica *In vitro* en astrocitos de cultivo primario

Autor:

Mitchell Martí Ariza

---

Luis Gonzalo Sequeda M.Sc.

Químico

Director de tesis

---

Sonia Luz Albarracín Cordero M. Sc. Ph. D

Licenciada en Biología

Co-Director

---

Zulma Yanira Casas M.Sc.

Licenciada en Biología

Jurado

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de

Julio de 1946

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, me ha dado la fuerza, la disciplina y el entendimiento. Has mantenido a mi padre conmigo*

*Agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana por la formación que me ha dado al cabo de estos maravillosos años.*

*A la Vicerrectoría Académica por la financiación de éste proyecto.*

*A mi tutora Sonia Luz Albarracín por su ayuda constante, confianza y apoyo en éste proceso*

*A mi director Luis Gonzalo Sequeda por todas sus enseñanzas para mi vida*

*Al profesor Jhon Jairo Sutachán por su constante acompañamiento*

*Al grupo de Terapia Celular y Molecular, su directora, profesores y mis queridos compañeros y amigos*

*A mis padres, por la crianza maravillosa, por su apoyo incondicional y por siempre creer en mí*

## Resumen

Los procesos metabólicos aeróbicos, como la respiración celular, tienen como producto la formación de especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species ROS) en la mitocondria y los peroxisomas (Seifried *et. al*, 2007). Si bien éstos compuestos tienen un papel fundamental en diversas rutas metabólicas, también son capaces de causar daño oxidativo a las proteínas, lípidos y ADN cuando se acumulan y los sistemas enzimáticos antioxidantes endógenos pierden la capacidad para inactivarlos (Valko *et. al*, 2007). Por ello las investigaciones se centran en la actualidad en compuestos antioxidantes de origen vegetal como fuentes alternas para tratar los efectos negativos de ROS, debido a su capacidad para estabilizar moléculas y participar en vías de señalización celular (Williams *et. al*, 2004). En el presente trabajo se estudiaron extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia (*Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale*) y se evaluaron los efectos sobre la proliferación de astrocitos de cultivo primario y la actividad antioxidante cuando las células están sometidas a estrés oxidativo. Los extractos se prepararon solos o en metanol para obtener diferentes fracciones del mismo y posteriormente se determinó la capacidad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS. Los extractos con mayor capacidad antioxidante se seleccionaron para los ensayos con células. Se determinó la citotoxicidad mediante el establecimiento de una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de los extractos. Se realizó un insulto con rotenona 1  $\mu\text{M}$  en los astrocitos incubados previamente por 48 horas con los extractos. Se cuantificaron las células por el método MTT, donde se evidenció un aumento en la proliferación de células tratadas con los extractos de las cuatro frutas (entre un 44 y un 75%), así como protección celular ante estrés oxidativo provocado por rotenona, reflejado en el aumento de la viabilidad celular (12-22% respecto al control tratado con rotenona). Los resultados obtenidos mostraron posibles nuevos mecanismos de protección neuronal frente al daño oxidativo tanto en condiciones normales (envejecimiento) así como en condiciones patológicas.

**Palabras clave:** Astrocitos, Estrés oxidativo, Defensa antioxidante, Polifenoles.

## Introducción

Los polifenoles son metabolitos secundarios vegetales que se caracterizan por la presencia de anillos fenólicos. Dentro del grupo de los polifenoles se destacan los flavonoides, las antocianinas y las ligninas. En los últimos años han cobrado gran importancia en la investigación alrededor de enfermedades como cáncer, cardiopatías, y algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson debido a que el aumento del estrés oxidativo parece estar implicado en la patogenia de estas (Valko *et. al*, 2007; Circu & Yee-Aw, 2010). Los compuestos fenólicos inactivan radicales libres puesto que actúan como “scavengers” y como donadores de

hidrógeno, aunque también existen claros indicios de que los polifenoles (especialmente los flavonoides) interactúan con diversas moléculas en rutas metabólicas, participando directamente en la generación de cascadas de señalización, lo cual evidencia las propiedades benéficas de éstos compuestos en relación a las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Birt *et. al*, 2001; Williams *et. al*, 2004). Las ROS participan en diferentes vías de señalización intracelular y son indispensables para las células (Seifried *et. al*, 2007). Pero cuando se acumulan en exceso los complejos enzimáticos antioxidantes endógenos pierden la capacidad de degradarlos y se convierten en agentes patógenos (Valko *et. al*, 2007; Circu & Yee-Aw, 2010). El cerebro en particular es más vulnerable al daño oxidativo debido al alto consumo de oxígeno respecto a otros órganos, además posee una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados así como presencia de iones metálicos como el Hierro ( $Fe^{++}$ ) y el Cobre ( $Cu^{++}$ ) que están implicados en reacciones de óxido reducción (Valko *et. al*, 2007). Sin embargo, el estudio de las implicaciones del estrés oxidativo a nivel del sistema nervioso no debe restringirse únicamente a las neuronas, debido a que se ha elucidado la importancia de las células gliales, como los astrocitos, no solo como soporte estructural de las neuronas y la vía mediante la cual se nutren, sino que tienen una relación directa con las funciones sinápticas mediante la expresión de receptores que también se encuentran en las neuronas, la expresión de canales iónicos entre otras funciones (Temburni & Jacob, 2001).

A raíz de los resultados de las investigaciones acerca de los compuestos con capacidad antioxidante en las plantas, los estudios se han centrado ahora en la incidencia de los mismos sobre las funciones celulares, específicamente lo que respecta a las reacciones Redox así como la activación o inhibición de diversas cascadas de señalización entre otros. Colombia, al ser un país megadiverso, posee la “materia prima” para competir en la creación de productos a base de plantas, razón por la cual se planteó un estudio alrededor de cuatro frutos de interés comercial: *Vitis labrusca* (Uva Isabella), *Bactris minor* (Corozo), *Averrhoa carambola* (Carambolo) y *Vaccinium meridionale* (Agraz o mortiño) (Angiosperm Phylogeny Group, 2011), en donde se evaluó la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales de los extractos de dichos especímenes, así como la actividad biológica en Astrocitos de cultivo primario, generando una aproximación a la posibilidad de que los compuestos frutales puedan solventar los efectos deletéreos causados por el estrés oxidativo.

## **Problema y Justificación**

El metabolismo mitocondrial conlleva a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), un tipo de radicales libres, dentro de los cuales se encuentran el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Seifried *et. al*, 2007). Los compuestos ROS tienen

un comportamiento dual en las células puesto que, por una parte cumplen funciones dentro de la señalización celular en diferentes rutas metabólicas, pero al acumularse se convierten en agentes perjudiciales que generan daños en lípidos, proteínas y DNA, lo que desencadena el estrés oxidativo, conllevando a problemas de índole mayor, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cardiopatías entre otras (Valko *et. al*, 2007).

El consumo de sustancias con actividad antioxidante puede ayudar a solventar ésta deficiencia enzimática debido a que aumentan la eficacia de los complejos Redox al disminuir la concentración de ROS en las células. Los compuestos antioxidantes de origen vegetal tienen la capacidad de reaccionar con las ROS transformándolas en moléculas estables, sin embargo también existen evidencias de su participación en vías de señalización para inhibir o activar procesos celulares relacionados al estrés oxidativo (Williams *et. al*, 2004; Valko *et. al*, 2007). Por ésta razón se planteó elucidar las interacciones entre compuestos vegetales y células, como base para la creación a futuro de alternativas terapéuticas en pro de solventar las patologías derivadas del estrés oxidativo.

## **Marco Teórico**

### ***Las plantas como fuentes de compuestos con propiedades terapéuticas***

El consumo de frutas y vegetales se ha asociado con beneficios para la salud debido a los compuestos con capacidad antioxidante presentes en ellos, tal como las vitaminas y polifenoles (como los flavonoides) (Fu *et. al*, 2011). Un gran número de investigaciones han llevado a entender el potencial terapéutico de los compuestos vegetales, como se evidencia en el estudio en la planta *Melissa officinalis*, perteneciente a la familia de las lamiáceas, en donde se utilizó el ejemplar completo, se detectó capacidad antioxidante además de actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, enzima que está ligada directamente en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (Dastmalchi *et. al*, 2009). Otro estudio con plantas fue el de Ping-Hsiao *et. al*, en el cual se evaluaron extractos de los frutos de *Morus atropurpurea* L. los cuales son ricos en fenoles y antocianinas, y se comprobó que hubo disminución en la producción del péptido amiloide así como una ligera mejora en la capacidad de memoria de ratones modificados genéticamente cepa SAMP que fueron alimentados con cierta cantidad del extracto como suplemento a la dieta normal (Ping-Hsiao *et. al*, 2010). También se ha determinado el contenido de antocianinas y polifenoles en el mortiño (o agraz) y su actividad antioxidante, además de sus efectos sobre la peroxidación de lípidos (Gaviria *et. al*, 2009). Compuestos que comienzan a venderse en el mercado como el resveratrol también son aislados de frutas y su actividad es conocida, como se muestra en el estudio de Tobar-Reyes *et al.* en donde se cuantifica la cantidad de éste compuesto en la uva (Tobar-Reyes *et al.*, 2009). Estudios como el de Molina-Quijada *et al.* específicamente con la cáscara de uva, Gite



*et al.* con híbridos cultivados en India resistentes a sequía y enfermedades, e incluso extractos de semilla de uva inoculados en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer (Farbood *et. al.*, 2009), corroboran que sus compuestos tienen actividad antioxidante (Gite *et al.*, 2010; Molina-Quijada *et al.*, 2010).

### ***Frutos de interés comercial en Colombia***

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas se constituyen en el objetivo de la investigación biomédica debido a lo que se conoce de ellas desde la perspectiva de la etnobotánica y los conocimientos adquiridos a raíz de los estudios sobre los compuestos como flavonoides, antocianinas, vitaminas entre otros.

Colombia, considerado uno de los 17 países megadiversos según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA, 2011), es también el segundo país del mundo en diversidad de plantas (Instituto Alexander von Humboldt, 2011), lo que representa la oportunidad para generar nuevas alternativas frente a la creación de medicamentos con base en compuestos naturales con potencial terapéutico, específicamente tratamientos relacionados a los efectos deletéreos de los radicales libres. Pero, para abordar dicho campo de investigación en Colombia es necesario realizar un estudio general en el cual se identifiquen aquellas especies botánicas cuyos metabolitos secundarios puedan servir como agentes terapéuticos, en pro de aislar compuestos o entender la dinámica en la cual éstos actúan, razón por la cual se planteó un estudio alrededor de la Uva Isabella, el Agraz, el Corozo y el Carambolo. A continuación se mencionan algunas de las características más relevantes de éstas plantas.

La uva Isabella, perteneciente a la familia *Vitaceae*, especie *Vitis labrusca*, conforma un grupo de plantas de hábito arbustivo o lianas, las cuales se encuentran distribuidas en casi todo el mundo en zonas de clima templado (Terral *et. al.*, 2010; Tropicos Database, 2011). Algunas especies como la *Vitis rupestris* o *Vitis riparia* son utilizadas como base para realizar injertos debido a su resistencia a patógenos, aunque el mayor uso comercial de la uva se encuentra en la fabricación de vino, con un 66% de la producción a nivel mundial, un 18.7% para su consumo como fruta fresca y el 7.7% de la producción se deshidrata para la producción de uvas pasas (Jackson, 2008; Terral *et. al.*, 2010). La uva Isabella es una variedad domesticada que evidencia cambios morfológicos considerables, dentro de los que destacan el incremento en el tamaño de los órganos de la planta (como el tamaño de los frutos, de las hojas y de la semilla) así como la evolución de plantas silvestres unisexuales a domesticadas hermafroditas (Jackson, 2008).

El agraz o mortiño es una planta perteneciente a la familia *Ericaceae*, especie *Vaccinium meridionale* SW la cual se encuentra en Venezuela y Colombia, y crece entre los 1800 y 3700 msnm (Tropicos Database, 2011). Su hábito es arbustivo y a pesar de ser cultivada comercialmente, no posee muchos estudios y tampoco una trayectoria de domesticación considerable (Catálogo de la Biodiversidad de Colombia). La planta se utiliza como fuente de leña así como para la elaboración de muebles, es fundamental también en procesos de restauración y recuperación de suelos; con los frutos del agraz se elaboran jugos, mermeladas, vinos, helados entre otros, además, se ha utilizado con fines medicinales para tratar la diabetes y problemas digestivos (Rache & Pacheco, 2010). Sin embargo, esta planta se encuentra amenazada principalmente por la deforestación y fragmentación de ecosistemas así como por la sobreexplotación de la misma (Rache & Pacheco, 2010).

El carambolo, pertenece a la familia *Oxalidaceae* especie *Averrhoa carambola* L. es originaria de Asia Tropical. Actualmente esta fruta se encuentra presente en numerosos lugares de los trópicos y subtropicos, en países tales como: Australia, Brasil, China, Estados Unidos, Francia, Haití, Indochina, Malasia, México y Tailandia. En Colombia, aunque no en grandes cultivos, se tiene una amplia distribución en los departamentos de Valle del Cauca, Córdoba, Antioquia, Caldas, Quindío y Tolima, y en la región de la Amazonía. En el ámbito mundial se reporta que el carambolo es un fruto bajo en calorías, buena fuente de potasio y vitamina A, y una fuente moderada de vitamina C. Asimismo, se registra que las variedades extremadamente ácidas son ricas en ácido oxálico y que el fruto de carambola puede contener hasta 14 aminoácidos (Villegas, 1998)

*Bactris minor*, conocido como corozo o corocito, pertenece a la familia *Arecaceae*, crece en Colombia en forma espontánea en la vertiente del Atlántico generalmente no muy adentro del continente. Es característico de zonas bajas y secas, usualmente por debajo de los cien metros de altura sobre el nivel del mar, con más frecuencia en playas marinas. También se le encuentra en las sabanas de Córdoba, Bolívar y Sucre en terrenos con problemas de drenaje (Heno-Castaño, 2011).

### ***Compuestos vegetales con características terapéuticas***

Los polifenoles, dentro de los cuales destacan los flavonoides y sus derivados, las antocianinas, las fitoalexinas entre otros, son metabolitos secundarios que se producen con fines defensivos así como para dar pigmento a las estructuras de la planta (Martinez-Flores *et. al*, 2002). Se encuentran presentes en todos los vegetales aptos para el consumo humano así como en muchas especies silvestres, aunque difieren en su cantidad en cada familia botánica (Zhang *et. al*, 2010). En general todos los compuestos se caracterizan por un número variado de grupos fenoles, y las moléculas primordiales como los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, los cuales tienen una

estructura común de difenilpiranos (C6-C3-C6), y las antocianinas además tienen un glúcido unido al aglicano (la parte polifenólica de la molécula) (Martinez-Flores *et. al*, 2002). Sin embargo, sus efectos benéficos para el organismo se basan en la capacidad de neutralizar (scavenger molecules) los radicales libres lo cual reduce los niveles de estrés oxidativo y previene la oxidación de biomoléculas que podría conllevar a daños celulares y posteriormente daños en diferentes tejidos y órganos (Beserra-Almeida *et. al*, 2011). Estos compuestos disminuyen la incidencia de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurodegenerativas (Lim *et. al*, 2007).

Los estudios realizados por Rice-Evans *et al.* muestran la capacidad latente de los polifenoles y compuestos de estructuras similares de comportarse como moléculas antioxidantes, debido al gran número de orbitales p no hibridizados que permiten que los radicales libres cedan sus electrones y éstos se transporten por toda la molécula, evitando así que reaccionen con lípidos, proteínas e incluso el material genético (Rice-Evans *et al.*, 1997). Así mismo, dichos compuestos tienen la capacidad de donar un electrón debido a los grupos hidroxilo, en donde el compuesto vegetal mismo se convierte en un radical pero su estructura conjugada (como es el caso de los flavonoides) permite que el electrón remanente sea relativamente inactivo (Birt *et. al*, 2001). Así pues, empleando métodos como el de Capacidad antioxidante en Trolox equivalentes (TEAC), Poder antioxidante basado en la reducción del hierro (FRAP), Contenido de fenoles totales a través del método Folin-Ciocalteu entre otros métodos basados en radicales libres comerciales, se ha comprobado la capacidad antioxidante en una gran cantidad de frutas tanto silvestres como cultivadas para su venta, y además se muestra una fuerte correlación entre el contenido de fenoles y su actividad antioxidante (Fu *et. al*, 2011).

Sin embargo, también se ha evidenciado que algunos compuestos vegetales, específicamente los flavonoides y sus derivados, inciden de forma positiva en el organismo pero no a nivel antioxidante, sino como moduladores en diferentes cascadas de señalización, entre otras, debido al potencial que tienen para unirse a los sitios de unión de ATP en un gran número de proteínas, incluyendo la ATPasa mitocondrial, Protein Quinasa A y C así como la topoisomerasa (Williams *et. al*, 2004).

Para contextualizar el estudio de los compuestos vegetales dentro de las investigaciones biomédicas, es necesario estudiarlos en relación a las especies reactivas del oxígeno, moléculas que, si bien tienen un papel fundamental dentro de la fisiología normal de los organismos, al acumularse generan daños en estructuras celulares y comprometen la viabilidad de las mismas cuando los sistemas endógenos son incapaces de controlar su concentración.

### ***Especies Reactivas del Oxígeno y su actividad biológica***

Las especies reactivas del oxígeno (ROS por su sigla en inglés) son radicales libres producto del metabolismo celular. En la mitocondria se reduce el O<sub>2</sub> a través de la cadena transportadora de electrones, lo cual genera una pequeña cantidad del anión superóxido, que se produce en los complejos I, III y IV. Éste se transforma en el peróxido de hidrógeno, el cual es un compuesto más estable y que tiene diferentes destinos. Por un lado, se puede movilizar hacia los sistemas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa y tioredoxin peroxidasa, y por otra parte puede servir como molécula señalizadora en el citosol y afectar diferentes rutas metabólicas (Bolaños *et. al*, 2009; Kowaltowski *et. al*, 2009).

Los ROS actúan como mensajeros en diferentes vías metabólicas, siendo fundamentales en los procesos de apoptosis, donde se activan señalizadores como el ASK 1, el cual es un regulador en la apoptosis activando la proteína JNK y la proteína p38 (Seifried *et. al*, 2007). Actuando junto a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), regula la proliferación celular mediante la activación directa de las proteínas ERK (Seifried *et. al*, 2007). Así mismo los ROS participan en la respuesta inmune innata mediante el incremento o disminución de la actividad de interleuquinas, e incluso la expresión génica se ve afectada por los compuestos reactivos del oxígeno, puesto que el factor de transcripción HIF-1 se ve alterado por la concentración de oxígeno, ya que cuando ésta es baja se transcribe HIF-1 para producir eritropoyetina, una hormona que estimula la formación de eritrocitos (Seifried *et. al*, 2007).

### ***Mecanismos para mantener la homeóstasis Redox intracelular***

Cada célula se caracteriza por una concentración específica de electrones almacenados determinada por la frecuencia en que se producen ROS y la frecuencia en que se remueven por acción de los antioxidantes internos, lo que constituye el estado Redox, en el cual los compuestos reactivos del oxígeno actúan sin ser dañinos para el organismo (Valko *et. al*, 2007). Para mantener dicha homeóstasis en las células, existen mecanismos conocidos como sistemas enzimáticos Redox, los cuales controlan la remoción de las ROS al reducirlas y hacerlas compuestos estables. El glutatión (GSH) es el tiol más abundante en las células eucariotas y tiene un papel clave en el proceso de apoptosis a través de su forma activa, pasando del estado reducido al oxidado (glutatión disulfuro) cuando hay estrés oxidativo (Circu & Yee-Aw, 2010). Dicho sistema actúa junto al sistema Redox tioredoxin (Trx), el cual es un catalizador en la reducción de disulfuros (Circu & Yee-Aw, 2010). Otro sistema que se haya íntimamente ligado a los anteriores es el de los nucleótidos de piridina, los cuales comprenden al NAD<sup>+</sup>/NADH y NADP<sup>+</sup>/NADPH, que son los donadores de electrones para que se recupere el estado del GSH y el Trx (Circu & Yee-Aw, 2010).

### ***Papel de ROS en la enfermedad***

Cuando las concentraciones de ROS se elevan demasiado el equilibrio redox se rompe, lo que ocasiona que los compuestos se comporten como agentes patógenos para las células (Seifried *et. al*, 2007). Los sistemas enzimáticos carecen de la capacidad de respuesta apropiada para remover los compuestos reactivos y éstos no encuentran moléculas con las cuales aparearse y hacerse estables, razón por la cual se ligan a lípidos, proteínas e incluso al material genético (Valko *et. al*, 2007).

Específicamente, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson también están relacionadas a la acumulación de ROS. Las mutaciones genéticas afectan las mitocondrias en las neuronas, lo que permite la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide (el cual participa en la aparición de la enfermedad de Alzheimer), así como también se han encontrado rastros que elucidan estrés oxidativo en cerebros de pacientes que sufrieron dicha enfermedad, a causa del daño en las mitocondrias por autofagia de las mismas (Bolaños *et. al*, 2009). Los daños a causa de ROS no solo afectan a las mitocondrias a nivel neuronal, sino que al aparearse con los lípidos y las proteínas afectan las membranas, receptores, moléculas señalizadoras y los organelos de las neuronas y células gliales (como células astrocíticas, oligodendrocíticas, células de schwann) principalmente en la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo, lo que conlleva a que se afecte la función motora, las capacidades relacionadas al aprendizaje, la memoria, las emociones entre otras capacidades cognitivas coordinadas por éstas partes del cerebro (Dani *et. al*, 2010).

### ***Importancia de las células gliales***

Ya que los efectos nocivos de las ROS son evidentes en la aparición de enfermedades neurodegenerativas, las células gliales juegan un papel esencial puesto que son la barrera de protección de las neuronas ya que conforman la barrera hematoencefálica, mantienen la homeostasis iónica especialmente de potasio, dan soporte nutricional y trófico a las neuronas e incluso responden ante lesiones provocadas, entre otras, por estrés oxidativo, y contrario a como se solía pensar, las células gliales tienen una participación activa en los procesos de sinapsis, ya que expresan receptores para una gran variedad de neurotransmisores cuya activación evoca respuestas como el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, liberación de ATP y glutamato, entre otras (Newman, 2003; Cao *et. al*, 2007).

Los astrocitos están encargados de la protección neuronal ante el estrés oxidativo. Sus mecanismos van desde la expresión de ciertos genes como el DJ-1, la acción de moléculas como el glutatión y la liberación de factores que incluso protegen a las neuronas sin la presencia de la glía, como lo evidencia el estudio de Cao *et al*. en donde células neuronales sobreviven a los efectos deletéreos de

los radicales libres cuando se encuentran en medio condicionado de Astrocitos (Chen *et. al*, 2001; Cao *et. al*, 2007; Mullett & Hinkle, 2011).

## **Objetivo general**

Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y su actividad biológica *in vitro* en astrocitos de cultivo primario.

## **Objetivos específicos**

- Evaluar la capacidad antioxidante y determinar el contenido de fenoles totales de los extractos de los cuatro frutos mediante los métodos DPPH, ABTS y RFC.
- Caracterizar el efecto dosis-respuesta de los extractos y su incidencia en la proliferación de astrocitos de cultivo primario.
- Evaluar el efecto de los extractos en cultivos celulares de astrocitos sometidos a estrés oxidativo.

## **Metodología**

### **1. Evaluación de la capacidad antioxidante**

#### **1.1. Preparación de los extractos**

Los frutos fueron obtenidos en almacenes de cadena en Bogotá. Para evaluar la actividad antioxidante se prepararon 2 tipos de extracto para todas las frutas: Jugo o zumo y extracto en solvente orgánico. En el caso del corozo y la uva se retiró la semilla. Solo en la uva se trabajaron la piel y la pulpa por separado.

- 1) Para la obtención de los jugos se pesaron 100 gr de fruta. Después se llevó a cabo una disgregación mecánica y el jugo obtenido se filtró y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . 20 ml de jugo de piel y de pulpa de uva se almacenaron en viales ámbar y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para luego ser liofilizados por 24-48 horas.
- 2) Por otra parte se pesaron 100 gr de cada fruto. Luego se disgregaron mecánicamente y se adicionaron 200 ml de metanol. Los macerados con metanol se almacenaron aislados de la luz por 1 semana y posteriormente se filtraron en otro recipiente. Dicho filtrado se rotaevaporó para extraer por destilación el solvente. La sustancia destilada se almacenó en frascos ámbar pequeños, se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó por 24-48 horas.
- 3) Para las semillas de *Vitis labrusca* se empleó una extracción con 2 solventes para obtener fracciones de compuestos de diferentes polaridades. Las semillas se secaron a la intemperie por 24 horas y luego se maceraron. Se pesaron 20 gr de semilla macerada y se pusieron en

un dispositivo Soxhlet y se dejaron con Acetato de Etilo por 2 horas. El producto obtenido se destiló por rotaevaporación para separar el solvente de los compuestos de la semilla. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento con Metanol (en otras semillas). El producto destilado de cada fracción se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó por 24-48 horas.

## 1.2. Evaluación de la Capacidad Antioxidante por DPPH y ABTS

Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizaron los métodos DPPH y ABTS. El método basado en la molécula 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) fue originalmente diseñado por Marsden Blois en 1958, y dentro de sus modificaciones posteriores destaca la de Brand-Williams *et. al*, que es el método utilizado en la actualidad. El proceso de evaluación de la capacidad antioxidante por DPPH consiste en utilizar dicha molécula, la cual es un radical libre estable que al mezclarse con una sustancia que le dona un átomo de hidrógeno pasa a su forma reducida, proceso que se puede observar y cuantificar ya que cuando la molécula se encuentra como radical es coloreada (violeta) y al reducirse pierde su color (Brand-Williams *et. al* 1995; Molyneux, 2004).

Para el protocolo desarrollado en el presente estudio se utilizaron 10 mg del radical DPPH y se diluyeron en 10ml de metanol analítico y mediante el espectrofotómetro se estableció la absorbancia entre 0.7-0.8 a una longitud de onda de 516nm, condiciones en las cuales se presenta la mayor sensibilidad del método (Molyneux, 2004).

El extracto liofilizado se diluyó en agua destilada desionizada para obtener un stock en ppm el cual oscilaba entre los 500 y los 5000 ppm. A partir del stock se prepararon diluciones para 5 concentraciones menores igualmente espaciadas entre sí para la curva de Abs vs. Tiempo (50, 100, 150, 200 y 250 ppm a partir de un stock de 500 ppm, por ejemplo). De cada concentración se adicionaron 25 $\mu\text{L}$  a una celda que contiene 975 $\mu\text{L}$  del radical DPPH previamente preparado, para llegar a un volumen final de 1ml en la celda. Cada minuto se leyó la absorbancia a la longitud de onda de 516 nm hasta que la gráfica se hizo estable, es decir, no mostró picos elevados o muy bajos. Se halló el % de inhibición mediante la ecuación  $\% I = [(A_o - A_e) / A_o] \times 100$ ; donde  $A_o$  se refiere a la absorbancia sin el extracto y  $A_e$  se refiere a la absorbancia con el extracto. Los cinco % I obtenidos se utilizaron para hacer una gráfica de dispersión % Inhibición vs. Concentración del extracto, en donde se obtuvo la ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ) mediante la cual se calculó la concentración inhibitoria al 50 % ( $IC_{50}$ ) de la siguiente forma:  $IC_{50} = (50-b)/m$  donde b es el punto de corte en el eje Y y m es la pendiente.

Dichos resultados se compararon mediante el Trolox, el cual es un análogo de la vitamina E (Tyrakowska *et. al*, 1999), y con la Vitamina C, los cuales tienen actividad antioxidante



comprobada. El protocolo para el Trolox y las vitamina C es igual al mencionado anteriormente para los extractos, ya que las diferentes concentraciones del Trolox y las Vitaminas equivalen a las 5 concentraciones del extracto, lo que permitió hacer una curva estándar que se comparó con la obtenida previamente.

Para los jugos (extractos no liofilizados), se realizó la prueba de capacidad antioxidante adicionando volúmenes diferentes del jugo (10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 30 $\mu$ L etc.). Con los volúmenes se calculó la ecuación de la recta de la misma forma que con extractos liofilizados y se halló el IC<sub>50</sub>. Se halló el valor de sólidos totales pesando el jugo antes y después de secarlo en el horno a 100 °C por 1 hora y calculando el delta del peso. Con el valor de peso seco y la densidad de los jugos se halló el valor en ppm que corresponde al volumen de jugo utilizado para inhibir el 50% del radical.

Por otra parte, el método ABTS es similar al DPPH, en el cual la molécula del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) se estabiliza por acción de los compuestos antioxidantes de los extractos. El radical ABTS se preparó disolviendo 10 mg del compuesto en 10 ml de agua y posteriormente se agregaron 2,4 mg de Persulfato de potasio. La solución preparada se dejó a temperatura ambiente en la oscuridad por 16 horas y posteriormente se refrigeró. El proceso es igual al que se emplea con el DPPH, salvo que se lee a una longitud de onda de 735 nm. De la misma forma que en el método anterior se tomaron 5 diferentes concentraciones de cada extracto a partir de un stock diluido en agua destilada desionizada y se halló la grafica absorbancia vs. tiempo para determinar el periodo estacionario. Se calculó el % de Inhibición y con éste el IC<sub>50</sub> a partir de la ecuación de la recta. Para los jugos se llevó a cabo el mismo proceso mencionado con anterioridad.

### 1.3. Determinación de fenoles totales RFC

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método desarrollado por Folin-Ciocalteu fundamentado en el carácter reductor de los polifenoles.

Primero se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico, los cuales se colocaron en un matraz aforado de 25 mL y se llevaron a volumen con agua destilada. Enseguida se preparó una dilución 1:10 con agua destilada a partir de la disolución patrón de ácido gálico. Se tomaron 20  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 60  $\mu$ L, 80  $\mu$ L y 100  $\mu$ L de la solución stock de ácido gálico en viales protegidos de la luz. A cada vial se adicionaron 250  $\mu$ L de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se homogenizó durante 5 min en el sonicador y posteriormente se adicionaron 250  $\mu$ L de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada vial. La solución de carbonato de sodio al 20% se preparó pesando 5 gr de Carbonato de Sodio en un balón aforado de 25 ml y se disolvieron en 15 ml de agua destilada con ayuda del sonicador y finalmente se completó el volumen a 25 ml. Cuando se tuvieron los tres reactivos mezclados en los viales se llevó a un volumen final de 2 ml



con agua destilada y se dejó reposar por 2 h. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm en el espectrómetro de ultravioleta-visible Thermo Genesys 10s.

Para determinar el contenido de Fenoles totales en los extractos se tomaron 2 mg de cada extracto liofilizado, se colocaron en un matraz erlenmeyer y se les agregó 50 mL de agua destilada y se agitó. Enseguida se tomaron 0,5 mL de cada una de estas soluciones y se mezclaron con 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min. Después se agregaron 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitó y se dejó reposar durante 90 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm con Espectrofotómetro Thermo Genesys 10s. Este procedimiento se realizó con cada una de las Frutas objeto de estudio por triplicado.

## Ensayos biológicos en astrocitos de cultivo primario

### 1.1. Obtención de astrocitos de cultivo primario

Se estandarizó el protocolo para la obtención de astrocitos de cultivo primario, realizando las siguientes modificaciones a los protocolos de Tovar-Franco y Mecha *et al.*:

Ratas Wistar (1 o 2 días de nacidos) fueron utilizadas para el sacrificio. La cabeza se lavó con etanol y se decapitaron las ratas. Se cortó la piel y posteriormente el cráneo para extraer el cerebro, quitando el bulbo raquídeo y el cerebelo. Los cerebros se colocaron en una caja de petri con Solución Salina de Hanks (HBSS Lonza) fría suplementada con 0,37% glucosa. Las meninges se retiraron con la ayuda de pinzas de punta fina y posteriormente los cerebros sin meninges se trasladaron a un falcon de 15ml con solución de Hanks y se centrifugaron 2 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante fue retirado y los cerebros fueron resuspendidos con 2ml de solución de Hanks y 200µL de Tripsina 2,5% suplementada con EDTA 2mM. Se incubó por 10 minutos y se neutralizó la tripsina con 4ml de Medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media, Lonza) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino. Con ayuda de una pipeta plástica de 5ml se llevó a cabo la disgregación mecánica por pipeteo, después se puso una punta azul en la pipeta y se realizó el mismo proceso, luego se reemplazó la punta azul por una amarilla y finalmente por una blanca. Cuando los cerebros se disgregaron y la solución se veía homogénea se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm. Finalmente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en DMEM suplementado con 10% Suero y antibióticos a una relación 1:100. Se sembró en placas de 75 cm<sup>3</sup> y el medio se cambió a los 3 días y al cabo de cinco días el cultivo primario de astrocitos se encontraba entre un 90-95% de confluencia (Tovar-Franco, 1994; Mecha *et al.*, 2011).

## 1.2. Dosis-Respuesta de los extractos en Astrocitos de cultivo primario

Cultivos primarios de astrocitos fueron expuestos a 3 diferentes dosis de los extractos de uva Isabella, corozo, carambolo y agraz a concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml. Las células viables fueron cuantificadas mediante el método MTT basado en la molécula Bromuro (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, la cual es reducida a formazan insoluble cuando interactúa con la enzima succinato deshidrogenasa presente en el complejo II de la cadena transportadora de electrones en la membrana interna mitocondrial. El protocolo para llevar a cabo la cuantificación celular por MTT, descrito originalmente por Mosmann en 1983 fue estandarizado durante la realización del presente estudio, realizando una modificación al protocolo descrito por Ahmadian *et. al* (2009).

Se sembraron células del cultivo primario de astrocitos en placas de 96 pozos (6000 células por pozo) y se incubaron por 24 horas para que se adhieran completamente. Pasadas las 24 horas se dosificaron con los extractos a concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml. Como control se utilizaron células sin extracto. Al cabo de 48 horas se preparó la solución de MTT diluyendo 5mg del reactivo en 1ml de Buffer fosfato salino (PBS) 1X. Se retiró el medio en el cual se encontraban las células, se lavó una vez con PBS y se adicionaron 100 µl de medio nuevo sin rojo fenol (Se utilizan Sales de Earle [EBS] 2X suplementado con glucosa). Se adicionaron 10µL de la solución de MTT por pozo directamente al medio y se incubó por 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se retiró el medio que contiene el MTT y se adicionaron 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales. Se incubó la placa por 5 minutos y se puso en el shaker por otros 5 minutos para obtener una mejor dilución y homogeneidad en el color. Finalmente se leyó en un lector de placas por espectrofotometría a 595nm.

A mayor absorbancia mayor es la cantidad de células vivas. Se leyó la absorbancia de células sin tratamiento (sin dosificar con extracto) como control. Mediante la ecuación % Viabilidad= (Absorbancia células tratadas \*100)/ Absorbancia células sin tratar se cuantificó el porcentaje de proliferación respecto al control.

## 1.3. Actividad antioxidante de los extractos en astrocitos sometidos a estrés oxidativo.

Cultivos de astrocitos fueron expuestos a rotenona, un agente pro oxidante y neurotóxico debido a que daña el complejo I de la cadena transportadora de electrones en la membrana interna mitocondrial y facilita la acumulación de superóxidos y peróxidos en la célula. Se sembraron 6000 células por cada pozo en placas de 96 pozos. Como control negativo se utilizaron células tratadas con rotenona a una concentración de 1 µM sin extracto, y el control positivo fueron células sin

ningún tipo de tratamiento. El grupo de células de estudio se dividió en tres grupos: **A.** Astrocitos dosificados con extracto a una concentración de 10 µg/ml y rotenona 1 µM. **B.** Astrocitos dosificados con extracto concentrado a 50 µg/ml y rotenona 1 µM. **C.** Astrocitos dosificados con extracto concentrado a 100 µg/ml y rotenona 1 µM. Las células de cada grupo de estudio se dejaron adherir 24 horas después de ser sembradas, se dosificaron con los extractos por 48 horas y se trataron con rotenona 24 horas más. Al cabo de éste tiempo se cuantificaron las células a través del método MTT como fue descrito anteriormente. Mediante la ecuación  $\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia células tratadas} * 100) / \text{Absorbancia células sin tratar}$  se cuantificó el porcentaje de proliferación respecto al control sin rotenona.

### **Análisis estadísticos**

Se indican las medias de cada experimento con el valor de la desviación estándar (SD). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba HSD de Tukey para comparaciones múltiples con ayuda del software GraphPad Prism Versión 5.

### **Resultados y Discusión**

#### **Preparación de los extractos**

Se prepararon diferentes extractos para las frutas *Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale*. Para obtener el extracto completo (jugo) se tomaron 100 gr de piel y pulpa los cuales se disgregaron mecánicamente y posteriormente se filtraron. Adicionalmente se preparó un segundo tipo de extracto en las mismas condiciones anteriores, a los que se le adicionaron 200 ml de metanol. En el caso de la uva se retiraron las semillas y se tomaron 20 gr que se maceraron y se realizó la extracción con dos solventes orgánicos: metanol y acetato de etilo. Los extractos acuosos con mezclas de solventes orgánicos también contienen sustancias no fenólicas como azúcares, proteínas, ácidos orgánicos los cuales pueden interferir en la evaluación de la actividad antioxidante (Tumbas *et al.*, 2011). Según estudios previos, la extracción con metanol es más eficiente que las mezclas de agua-metanol, especialmente para polifenoles y antocianinas monoméricas, compuestos conocidos por su gran capacidad antioxidante (Paladino, 2007; Da Silva *et al.*, 2011).

**Tabla 1. Extractos obtenidos de los 4 frutos**

Material Vegetal	Extracto			Liofilizado
	Acuoso	Metanol	Acetato de etilo (A.E)	
<i>Vitis labrusca</i> Semilla		X	X	Metanol y A. E

<i>Vitis labrusca</i> piel	X	X	Metanol
<i>Vitis labrusca</i> Pulpa	X	X	Metanol
<i>Bactris minor</i>	X	X	Metanol
<i>Averrhoa carambola</i>	X	X	Metanol
<i>Vaccinium meridionale</i>	X	X	Metanol

### Actividad antioxidante extractos de *Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale*

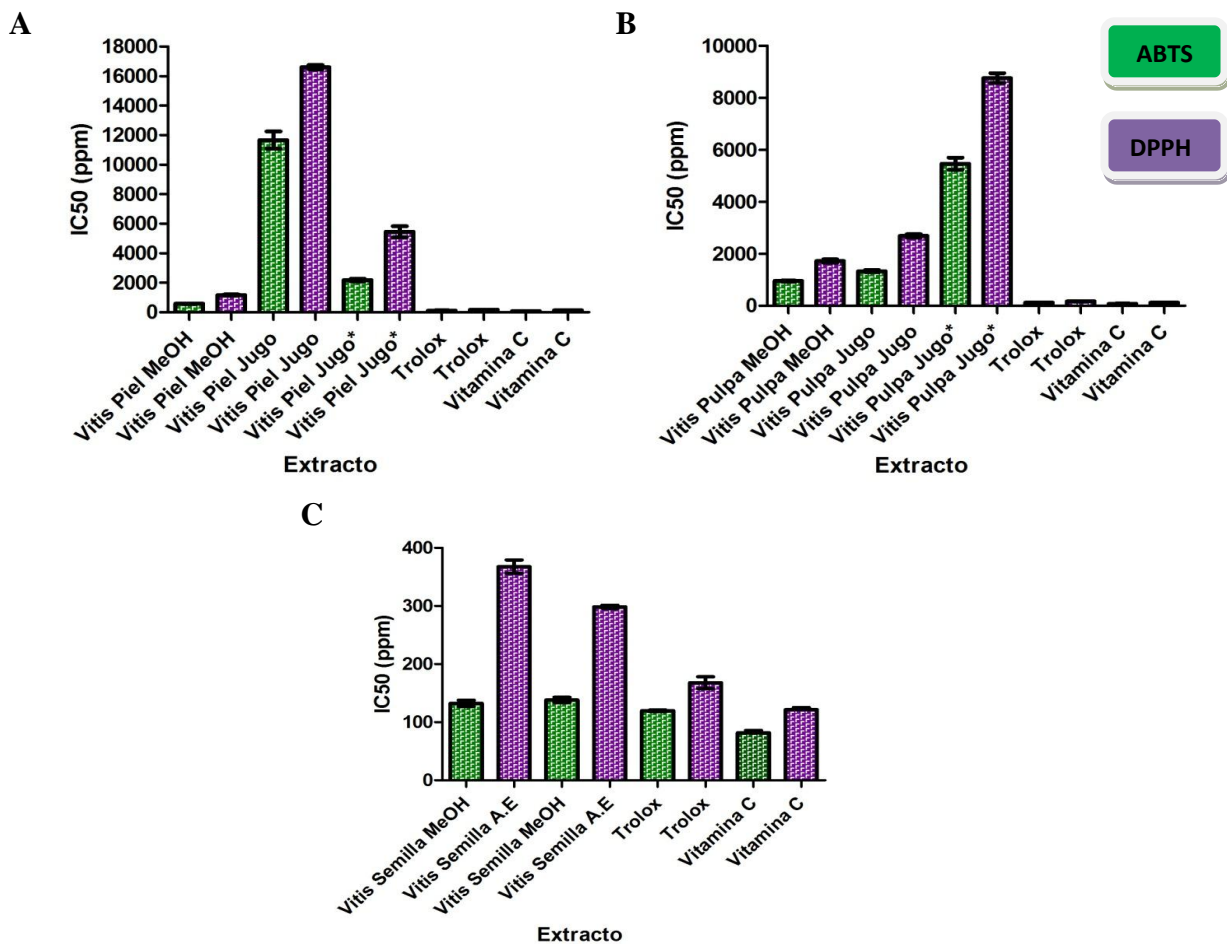
La capacidad antioxidante de los extractos fue medida a través de los métodos ABTS y DPPH. Se halló la concentración Inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) como se explica en la metodología y se compararon los IC<sub>50</sub> de los jugos y los extractos en metanol. En el caso de *Vitis labrusca*, cuyo fruto cuenta con partes diferenciables, se evaluó la capacidad antioxidante de cada una de ellas. La capacidad antioxidante de cada extracto fue comparada con los controles Trolox y Vitamina C.

**Tabla 2. Capacidad Antioxidante de los extractos de las 4 frutas**

Fruta	Extracto	ABTS	DPPH
		IC <sub>50</sub> (ppm)	IC <sub>50</sub> (ppm)
<b>Uva Isabella</b>	Pulpa MeOH*	950,5 ± 36	1718,8 ± 115,7
	Piel MeOH*	573,8 ± 44,9	1164,6 ± 69,2
	Semilla MeOH*	132,6 ± 9,2	367,6 ± 19,9
	Semilla Acetato de Etilo*	138,2 ± 7,8	298,5 ± 4,5
	Piel Jugo	11660,0 ± 1014,3	16599,6 ± 246,6
	Pulpa jugo	1330,4 ± 77,7	2689,0 ± 116,5
	Piel Fresco*	2176,7 ± 156,5	5451,4 ± 641,6
	Pulpa Fresco*	5462,1 ± 402,4	8758,1 ± 319,7
<b>Carambolo</b>	Jugo	6156,0 ± 1281,1	11378,3 ± 2513,6
	MeOH*	1708,1 ± 27,1	2337,7 ± 124,7
<b>Corozo</b>	Piel-Pulpa MeOH*	1174,8 ± 62,5	3896,5 ± 144,9
	Piel-Pulpa Jugo	1306,8 ± 60,1	3973,3 ± 486,6
<b>Agraz</b>	MeOH*	152,1 ± 9,8	913,95 ± 216,0
<b>Controles</b>	Trolox	119,7 ± 2,5	167,9 ± 17,8
	Vitamina C	81,9 ± 6,7	121,5 ± 6,3

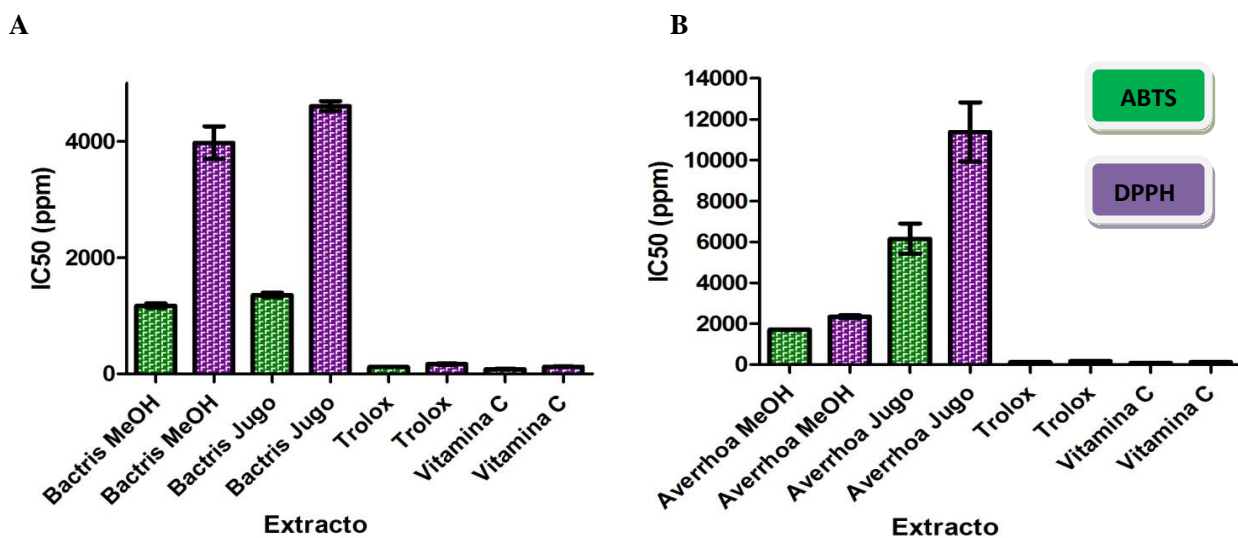
\* Los extractos fueron liofilizados.  
Se presenta la media±SD.

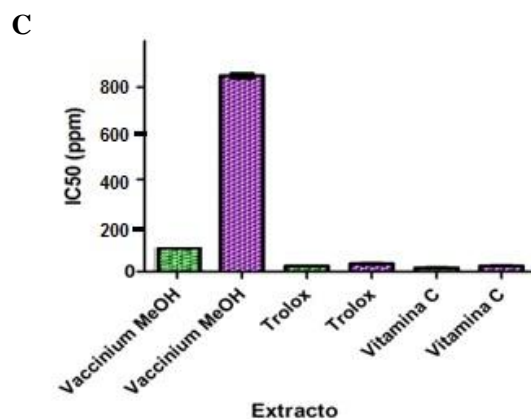
Se observó que los extractos en metanol (y acetato de etilo para el caso de la semilla de *Vitis labrusca*) tienen mejor capacidad antioxidante respecto a los jugos. Esto se denota al poseer un IC<sub>50</sub> bajo, lo que implica que se requiere una menor concentración del extracto para inhibir el 50% del radical (ABTS o DPPH).



**Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos de *Vitis labrusca*.** **A** Los extractos de jugo de piel fueron comparados con el jugo liofilizado de piel (\*). **B** El extracto de pulpa en metanol presenta el IC<sub>50</sub> más bajo, mientras que el jugo liofilizado (\*) tiene el IC<sub>50</sub> mayor. El IC<sub>50</sub> del jugo de la pulpa es similar al del extracto en metanol. **C** Los extractos en metanol y acetato de etilo de la semilla de uva tienen IC<sub>50</sub> bajos comparados con los extractos anteriores.

La semilla del fruto de *Vitis labrusca* presenta uno de los IC<sub>50</sub> más bajos, de  $132,6 \pm 9,2$  mediante el método ABTS y  $367,6 \pm 19,9$  por DPPH para el extracto en metanol y  $138,2 \pm 7,8$  y  $298,5 \pm 4,5$  para el extracto en acetato de etilo por los métodos ABTS y DPPH respectivamente.





**Figura 2. Actividad antioxidante de los extractos de *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale*.** **A** El extracto de *Bactris minor* en metanol presenta IC<sub>50</sub> similar al del jugo. Sin embargo sus IC<sub>50</sub> son elevados respecto a los controles Trolox y Vitamina C. **B** El extracto de *Averrhoa carambola* en metanol presenta IC<sub>50</sub> bajo respecto al jugo. Ambos IC<sub>50</sub> son mucho más elevados que los de los controles Trolox y Vitamina C. **C** El extracto en metanol de *Vaccinium meridionale* evaluado por ABTS presenta un IC<sub>50</sub> similar al de los controles Trolox y Vitamina C. sin embargo, existe una diferencia notoria con el IC<sub>50</sub> evaluado por DPPH.

Los extractos del fruto de *Averrhoa carambola* (jugo y metanol) presentan amplias diferencias entre sí en relación a la capacidad antioxidante, con un IC<sub>50</sub> de  $6156 \pm 1281,1$  por ABTS y  $11378,3 \pm 2513,6$  por DPPH para el jugo y  $1708,1 \pm 27,1$  por ABTS y  $2337,7 \pm 124,7$  por DPPH para el extracto en metanol (Fig. 2.B). Por otra parte, el extracto en metanol de *Bactris minor* con IC<sub>50</sub> de  $1174,8 \pm 62,5$  (ABTS) y  $3896,5 \pm 144,9$  (DPPH) no presenta mayores diferencias en la capacidad antioxidante respecto al jugo, cuyos IC<sub>50</sub> son  $1306,8 \pm 60,1$  (ABTS) y  $3973,3 \pm 486,6$  (DPPH) (Fig. 2.A). Dicha situación podría deberse a que la pulpa en la mayoría de los casos tenía un color pálido, reflejo de cantidad reducida de polifenoles (García *et al.*, 2004). El *Vaccinium meridionale* presenta una marcada diferencia en la capacidad antioxidante de su extracto en metanol entre los métodos DPPH y ABTS ( $913,95 \pm 216$  y  $152,1 \pm 9,8$  respectivamente) (Fig. 2.C).

Para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos, mezclas de moléculas o alimentos se utiliza la reacción de dichos compuestos con sustancias cromógenas de naturaleza radical (Kuskoski *et al.*, 2005). Sin embargo, en todos los extractos existe una capacidad antioxidante mayor mediante el método ABTS en relación al DPPH. Estas diferencias se pueden atribuir a las longitudes de onda a las cuales se realiza cada uno de los ensayos (735nm ABTS y 516nm en DPPH), ya que ciertos compuestos coloreados como las antocianinas pueden interferir en las medidas del radical (Beserra-Almeida *et al.*, 2011). Por otra parte la estructura química tanto de los radicales DPPH y ABTS así como la de los compuestos vegetales puede incidir sobre los resultados obtenidos, puesto que una pequeña molécula que tiene un mejor acceso al sitio donde se halla el radical mostrará una aparente capacidad antioxidante mayor (Beserra-Almeida *et al.*, 2011). Finalmente, algunas reacciones con ciertos compuestos fenólicos y el DPPH son reversibles, resultando en lecturas bajas de capacidad

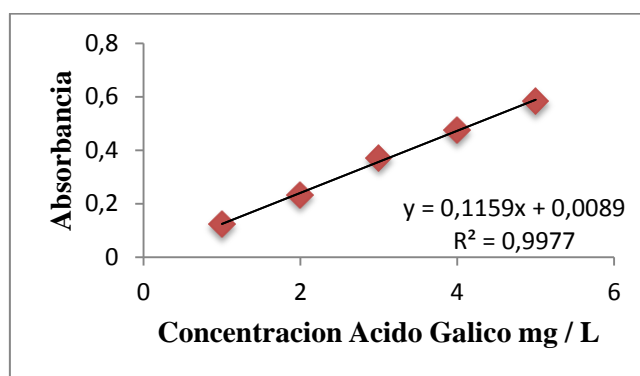


antioxidante (Beserra-Almeida *et al.*, 2011). El método ABTS tiene la ventaja de ser un método rápido y bastante sensible, sin embargo implica la preparación del radical mediante una reacción con Persulfato de potasio; por otra parte el DPPH es el método más utilizado y el radical se consigue comercialmente listo para usar (Kuskoski *et al.*, 2005; Beserra-Almeida *et al.*, 2011).

### Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales de cada extracto se obtuvo a partir de la curva de calibración del ácido gálico, en donde los valores de absorbancia del extracto se reemplazan en la ecuación de la recta  $y = 0,1172 + 0,0042x$  (Fig. 5) para obtener finalmente el contenido de fenoles expresado en mg de Ácido Gálico/100 gr de fruta (Tabla 3, Fig. 6). El contenido de fenoles totales solo fue estimado para los extractos en metanol, debido a que presentan mayor capacidad antioxidante respecto a los jugos (En el caso de *Bactris minor* no existen diferencias entre el extracto en metanol y el jugo, pero se utilizó el extracto en metanol para obtener resultados comparables respecto a los otros extractos).

Los extractos en metanol se relacionan con una mayor capacidad antioxidante debido a que éste solvente así como otros solventes orgánicos (como el etanol, acetato de etilo, acetona entre otros) son utilizados en la primera fase de extracción de compuestos polifenólicos como catequinas, proantocianidinas, flavonas, flavononas e isoflavonas (Birt *et al.*, 2001; Arranz-Martinez, 2010).

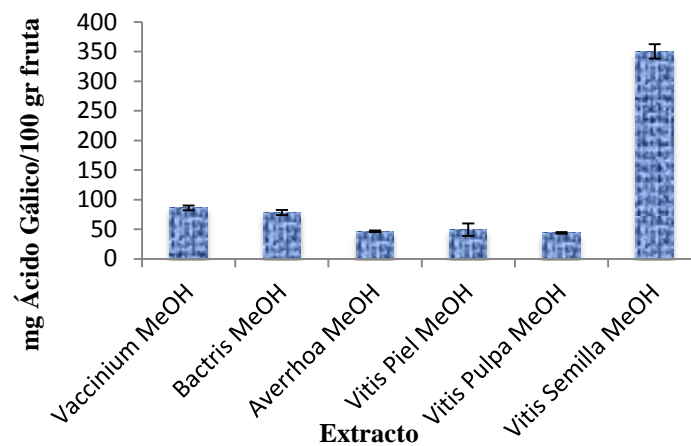


**Figura 5. Curva de calibración Ácido Gálico.** Se realizó la curva de calibración a partir de 5 concentraciones del ácido gálico (mg/L), donde se halló la ecuación de la recta y a partir de ella se reemplazan los valores de absorbancia de los extractos que han sido tratados con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

**Tabla 3. Contenido de fenoles totales expresados en mg de Ácido Gálico/100 gr de fruta.**

Extracto*	(mg Ácido gálico/100 gr)
<i>Vaccinium meridionale</i> MeOH	86,05 ± 4,12
<i>Bactris minor</i> MeOH	78,11 ± 4,3
<i>Averrhoa carambola</i> MeOH	46,36 ± 1,42
<i>Vitis labrusca</i> Piel MeOH	49,31 ± 10,43
<i>Vitis labrusca</i> Pulpa MeOH	43,82 ± 1,37
<i>Vitis labrusca</i> Semilla MeOH	350,44 ± 12,22

Los extractos con mayor cantidad de fenoles totales son el *Vaccinium meridionale* con  $86,05 \pm 4,12$  mg de ácido gálico/100 gr de fruta, posiblemente debido a su alta concentración de antocianinas y otros fenoles (Gaviria-Montoya *et. al.*, 2009; Garzón *et. al.*, 2010), *Bactris minor* con  $78,11 \pm 4,3$  mg de ácido gálico/100 y la semilla de *Vitis labrusca* con  $350,44 \pm 12,22$  mg de ácido gálico/100 (Tabla 3). La gran capacidad antioxidante de la semilla de *Vitis labrusca* es reflejo del contenido de fenoles totales en dicha parte del fruto (Fig. 6), lo cual se corrobora mediante estudios previos en los cuales se demuestra que la semilla de las uvas posee el 63% del total de polifenoles del fruto entero (Paladino, 2007).



**Figura 6. Contenido de fenoles totales de los extractos en metanol de las 4 frutas (mg de Ácido Gálico/100 gr de fruta).** El extracto de *Vitis labrusca* semilla en metanol tiene una gran cantidad de fenoles en comparación con los demás extractos.

Estudios realizados en frutos de diversas plantas demuestran que existe correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (Kuskoski *et al.*, 2005; Beserra-Almeida *et al.*, 2011). Ello se comprueba en el presente estudio, al observar el contenido de fenoles totales de la semilla de *Vitis labrusca* y su capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH (Fig. 1, Fig. 6), así como con los otros frutos que tienen un contenido de fenoles menor que la semilla de *V. labrusca* y así mismo su actividad antioxidante es menor. Por otra parte, los frutos pigmentados de colores oscuros como el rojo o morado (en éste caso *Vaccinium meridionale*, *Bactris minor*, *Vitis labrusca*) tienen una mayor cantidad de fenoles respecto a los frutos de colores pálidos (como el carambolo) (Tabla 3), razón por la cual también se relacionan dichos frutos oscuros como potentes antioxidantes (García *et al.*, 2004).

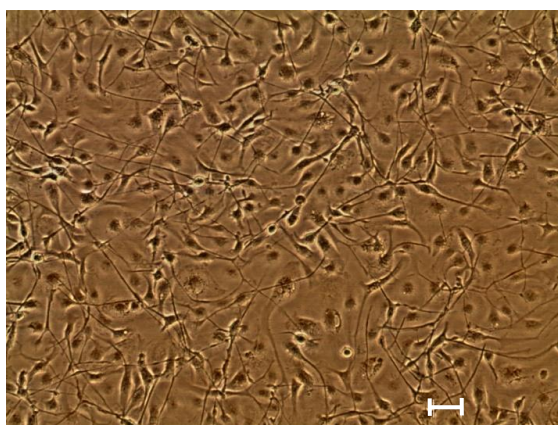
El potencial terapéutico de los compuestos de un fruto puede ser estimado en primera instancia por su capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales. Pero éstos no pueden ser descritos a fondo por un solo método debido a la mezcla de diferentes antioxidantes con mecanismos de acción



variados que involucran sinergias o antagonismos entre los mismos (Beserra-Almeida *et al.*, 2011). Así pues, es necesario evaluar la capacidad antioxidante a través de métodos con diferentes objetivos de estudio (como scavenging ability, propiedades quelantes, donadores de electrones entre otros) que permitan elucidar características más detalladas acerca de los compuestos antioxidantes (Beserra-Almeida *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011).

### **Astroцитos de cultivo primario**

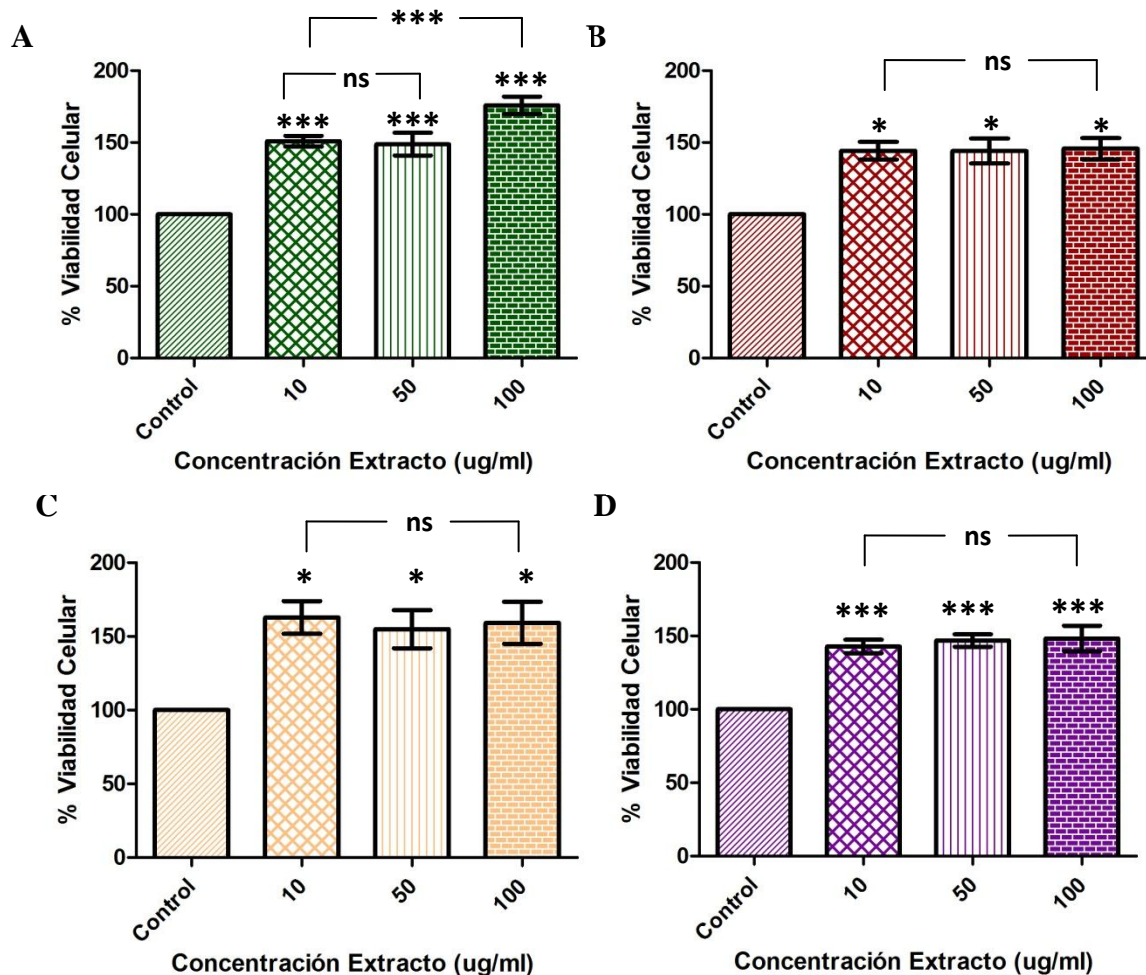
Los astroцитos fueron obtenidos a partir de ratas Wistar de 1-2 días de nacidos. En ésta etapa del desarrollo cerebral se encuentra una cantidad considerable de astroцитos, mientras que las neuronas ya se encuentran diferenciadas y por ende son más sensibles al proceso de disgregación mecánica y enzimática al que el tejido cerebral es sometido. Las células formaron la monocapa al 5 día de haber sido sembradas y había un porcentaje muy pequeño de células apoptóticas (Fig. 7.). Una de las modificaciones del protocolo de extracción consistió en una disminución en la concentración y el tiempo de exposición a la tripsina, la cual se utilizó 1X por 10 minutos. Esto redujo el estrés al que fueron sometidas las células antes de ser sembradas y garantizó un cultivo de células sanas.



**Figura 7. Astroцитos de cultivo primario.** 5 días después de haber sido sembrados los astroцитos alcanzaron entre un 90-95% de confluencia. La foto fue tomada mediante microscopía óptica (10X) con una cámara Optika Pro 3. Barra de escala= 100 µm.

### **Dosis-Respuesta de los Extractos de *Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale***

Los astroцитos de cultivo primario fueron dosificados con 3 concentraciones de los extractos (10, 50 y 100 µg/ml) en las cuales se ha encontrado actividad Dosis-Respuesta evocada por los polifenoles cuando son inoculados en astroцитos, incluso interviniendo en vías de señalización intracelulares, siendo 100 µg/ml la concentración más efectiva (Fujishita *et al.*, 2009) y se determinó la viabilidad celular por el método MTT. La proliferación se expresó en porcentaje de viabilidad celular, el cual fue hallado a través de la ecuación referida en la metodología.



**Figura 8. Dosis-Respuesta de los 4 Extractos.** El efecto Dosis-Respuesta se expresa en % Viabilidad de los astrocitos tratados respecto al control, el cual consiste en astrocitos sin tratamiento. Se realizaron 3 réplicas del ensayo, cada una con n=4. **A** Las 3 concentraciones del extracto de *Vitis labrusca* mostraron diferencias respecto a la proliferación de los astrocitos control (\*\*\* P<0,001). El extracto de 100  $\mu$ g/ml presentó diferencias respecto a los dos tratamientos restantes (\*\*\* P<0,001), los cuales no tuvieron efectos diferentes sobre las células (ns P>0,05). **B** Las 3 concentraciones del extracto de *Bactris minor* mostraron cambios en la proliferación celular respecto al control pero no así entre tratamientos (\* P<0,05; ns P>0,05). **C** Los extractos de *Averrhoa carambola* evidenciaron mayor proliferación en las células dosificadas con las 3 concentraciones, sin embargo no hay diferencias en la proliferación entre los tratamientos (\* P<0,05; ns P>0,05). **D** El *Vaccinium meridionale* muestra efectos sobre la proliferación de astrocitos, mas no hay diferencias entre tratamientos (\*\*\* P<0,001; ns P>0,05). Todos los valores de significancia se estimaron sobre los datos crudos de absorbancia mediante la prueba HSD de Tukey.

Las concentraciones del extracto de *Vitis labrusca* en acetato de etilo muestran una incidencia positiva sobre la proliferación de los astrocitos (Fig. 8), ya que el porcentaje de viabilidad fue de  $150.89 \pm 7.47$  para la concentración de 10  $\mu$ g/ml,  $148.82 \pm 15.85$  para 50  $\mu$ g/ml y  $175.89 \pm 11.99$  para 100  $\mu$ g/ml (\*\*\*P<0,001 respecto al control), lo que representa un aumento en la proliferación del 50.89% y 48.82% para las bajas concentraciones y de un 75.89% para la concentración de 100  $\mu$ g/ml, la cual fue mayor también a las concentraciones 10 y 50  $\mu$ g/ml (\*\*\*p<0,001). El extracto de *Bactris minor* tiene un efecto sobre la proliferación de las células (\*P<0,05) (Fig. 8) mostrando un aumento en la proliferación del 44.19%, 44.09% y 45.67% para las concentraciones de 10, 50 y 100

$\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Para el extracto de *Averrhoa carambola* se obtuvieron porcentajes de viabilidad de  $162.83 \pm 22.32$  en la concentración más baja,  $154.86 \pm 25.80$  para  $50 \mu\text{g/ml}$  y  $159.14 \pm 28.55$  en la concentración más alta (Fig. 8), lo que evidencia una proliferación de entre el 54% y el 62% respecto al control (\* $P < 0,05$ ). Las concentraciones del extracto de *Vaccinium meridionale* mostraron un aumento en la proliferación de los astrocitos respecto al control (\*\* $P < 0,001$ ), con porcentajes de proliferación de  $142.80 \pm 9.10$  para la concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $146.86 \pm 8.41$  para  $50 \mu\text{g/ml}$  y  $148.24 \pm 17.20$  para  $100 \mu\text{g/ml}$ . A excepción de la concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$  del extracto de semilla de *V. labrusca*, ninguna concentración en los 3 extractos restantes mostró cambios significativos entre sí (ns  $P > 0,05$ ).

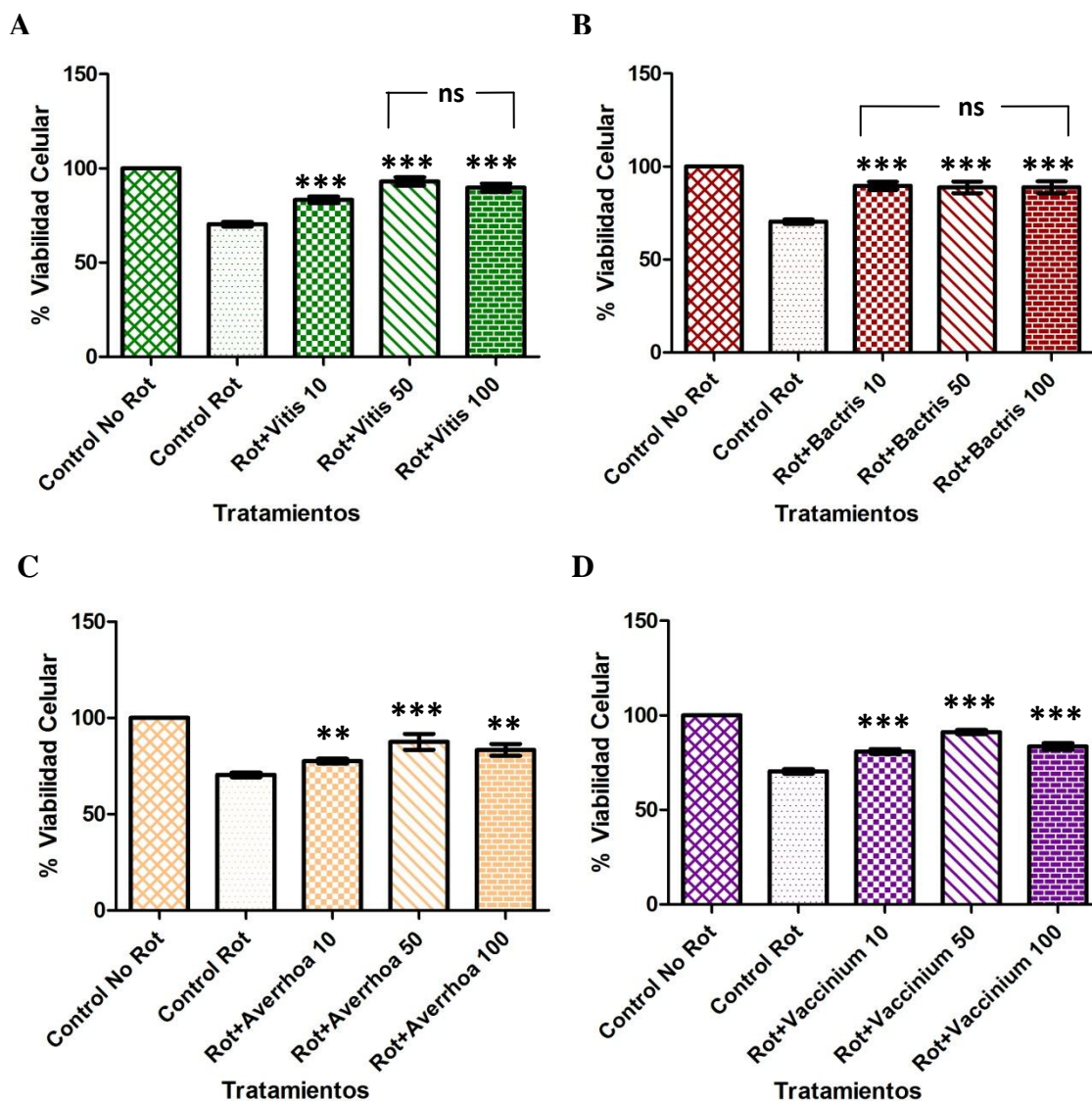
En los ensayos celulares se emplearon los extractos metanólicos, dado que la capacidad antioxidante de estos fue mayor que la de los extractos acuosos (Tabla 3). En los resultados se muestra un claro efecto de los extractos sobre la proliferación de los astrocitos. Este efecto puede ser explicado ya que estudios previos han demostrado que los compuestos polifenólicos, específicamente los flavonoides, tienen la capacidad de interactuar con vías de señalización que involucran, entre otras, la activación de la vía ERK-CREB y la PI3-quinasa-mTOR (Williams *et al.*, 2004; Williams & Spencer, 2011). Estas rutas parecen estar implicadas en cambios en la plasticidad sináptica; la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y la disminución de la presión sanguínea para controlar la función vascular (Spencer *et al.*, 2009). Sin embargo, las interacciones entre flavonoides y rutas metabólicas que pueden explicar el aumento en la proliferación de los astrocitos son la inhibición de la vía JNK y ASK1 junto a la activación de ERK1/2, las cuales representan la inhibición de la apoptosis y la supervivencia celular (Williams *et al.*, 2004; Williams & Spencer, 2011).

El extracto que mostró mayor actividad fue el de la semilla de *V. labrusca*, específicamente en la concentración  $100 \mu\text{g/ml}$ . Estudios previos como el de Fujishita *et al.* corroboran el hecho de haber encontrado la mayor respuesta en dicho extracto a esa concentración, y además fortalece la hipótesis de que los compuestos polifenólicos en la semilla de uva (así como en otras frutas) inciden directamente en cascadas de señalización y expresión de genes (Fujishita *et al.*, 2009).

### **Efecto de los Extractos de *Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale* en Astrocitos tratados con Rotenona**

Para evaluar el efecto de los extractos en astrocitos de cultivo primario tratados con rotenona, las células se dosificaron con las 3 concentraciones de los extractos ( $10$ ,  $50$  y  $100 \mu\text{g/ml}$ ) y luego

fueron tratadas con rotenona 1 $\mu$ M. Las células fueron cuantificadas por el método MTT y se estimó el porcentaje de viabilidad como medida de la proliferación celular.



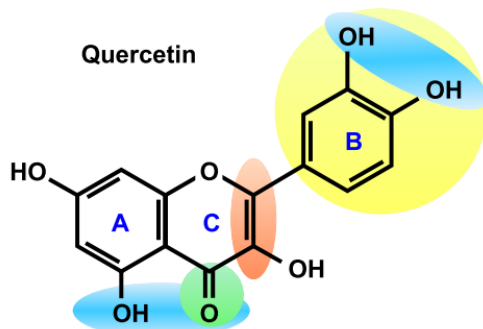
**Figura 9. Efecto de los 4 Extractos sobre Astrocitos dosificados con Rotenona.** El efecto de los extractos sobre los astrocitos tratados con rotenona 1  $\mu$ M se expresa en % de Viabilidad respecto al control sin rotenona el cual consiste en astrocitos sin ningún tratamiento. Se utilizó otro control de células sin ningún tratamiento. Los extractos se dosificaron a concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu$ g/ml. Se realizaron 2 réplicas del ensayo, cada una con n=4. Todos los controles tratados con rotenona son diferentes a los controles sin rotenona (\*\*\*P<0,001; datos no mostrados) **A** Los astrocitos dosificados con las 3 concentraciones de los extractos de *Vitis labrusca* evidencian un mayor porcentaje de viabilidad respecto a los que fueron tratados con rotenona 1 $\mu$ M sin extracto (\*\*\* P<0,001). Entre las concentraciones de 50 y 100  $\mu$ g/ml no hay cambios respecto a la proliferación celular (ns P>0,05). **B** Las células tratadas con el extracto de *Bactris minor* y rotenona 1 $\mu$ M muestran un porcentaje de viabilidad mayor que las tratadas solo con rotenona, sin embargo no hay cambios entre las concentraciones utilizadas del extracto (\*\*\* P<0,001; ns P>0,05). **C** Las concentraciones 10 y 100  $\mu$ g/ml (\*\* P<0,01) y 50  $\mu$ g/ml (\*\*\*P<0,001) del extracto de *Averrhoa carambola* muestran efecto sobre la proliferación de astrocitos respecto al control con rotenona. **D** Las células dosificadas con el extracto de *Vaccinium meridionale* y rotenona 1  $\mu$ M muestran un aumento en la proliferación en relación al control de astrocitos tratados con rotenona sin extracto (\*\*\* P<0,001). Todos los valores de significancia se estimaron sobre los datos crudos de absorbancia mediante la prueba HSD de Tukey.



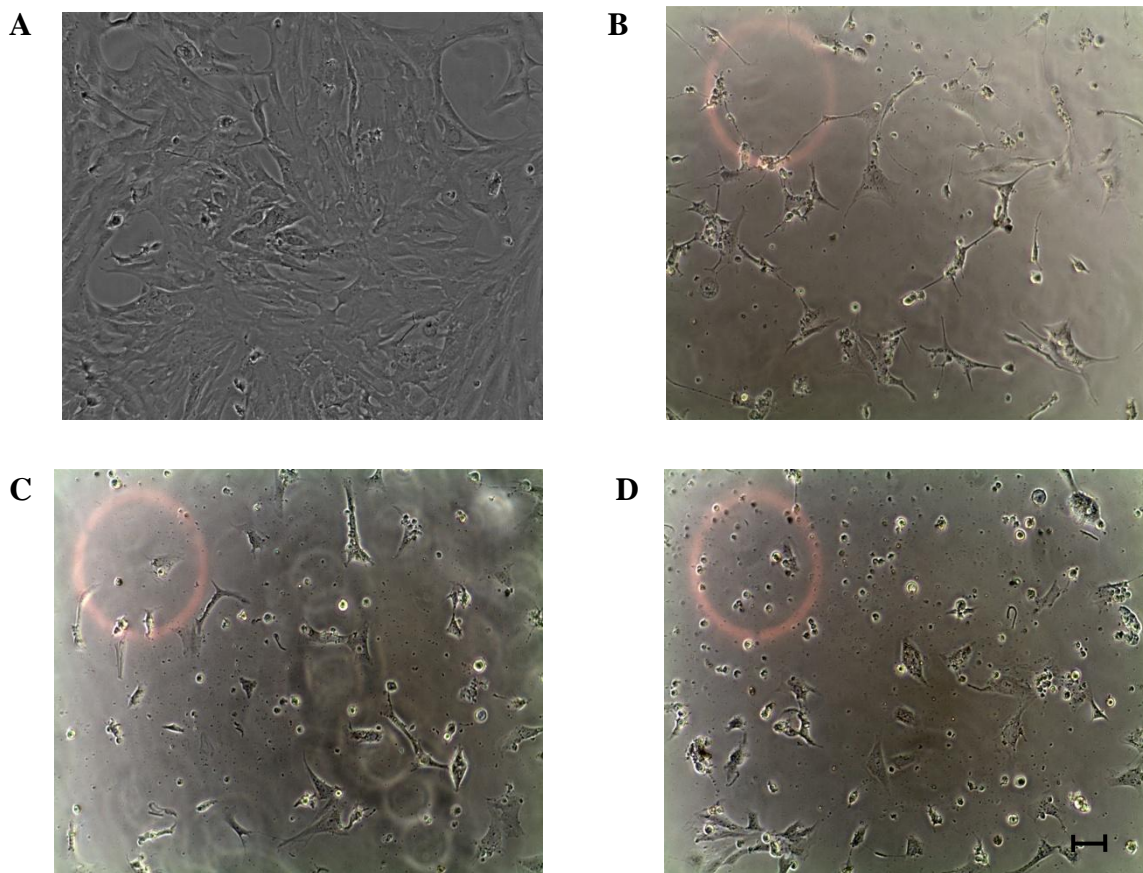
Al tratar con rotenona 1  $\mu$ M los astrocitos dosificados previamente con las 3 concentraciones de los extractos de *Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Averrhoa carambola* y *Vaccinium meridionale* se observaron efectos sobre la proliferación celular cuando se compararon con el control tratado con rotenona, cuyo porcentaje de viabilidad es de  $70.39 \pm 2.35$  (Fig. 9). Los extractos de semilla de *Vitis labrusca* muestran un aumento en la viabilidad celular cuando ésta se compara con los astrocitos control tratados solo con rotenona ( $***P < 0,001$ ). Los porcentajes de viabilidad son  $83.31 \pm 3.42$  para 10  $\mu$ g/ml,  $93.12 \pm 4.43$  para 50  $\mu$ g/ml y  $89.85 \pm 4.28$  para 100  $\mu$ g/ml, lo que representa un aumento entre el 12% y el 22%. Las concentraciones del extracto de *Bactris minor* mostraron una proliferación del  $89.64 \pm 4.35$  para la concentración de 10  $\mu$ g/ml,  $88.81 \pm 6.35$  para 50  $\mu$ g/ml y  $88.90 \pm 6.37$  para 100  $\mu$ g/ml ( $***P < 0,001$  respecto al control). El extracto de *Averrhoa carambola* tuvo efecto sobre la proliferación de los astrocitos, especialmente en la concentración de 50  $\mu$ g/ml cuando se la comparó con el control ( $***P < 0,001$ ). Las concentraciones de 10 y 100  $\mu$ g/ml también evidenciaron un aumento en la proliferación ( $**P < 0,01$ ). Finalmente, las concentraciones del extracto de *Vaccinium meridionale* permitieron una proliferación mayor en las células dosificadas con dicho extracto ( $***P < 0,001$ ), con un porcentaje de viabilidad en la concentración 10  $\mu$ g/ml de  $80.93 \pm 2.41$ ,  $91.22 \pm$  en la concentración de 50  $\mu$ g/ml y  $83.54 \pm 3.53$  en la de 100  $\mu$ g/ml.

El presente estudio demostró que los compuestos de los extractos presentes en los 4 frutos tienen efecto sobre la supervivencia de células sometidas a estrés oxidativo por rotenona. La rotenona es un compuesto de origen vegetal utilizado clásicamente como insecticida, pero debido a su fácil paso a través de las membranas biológicas y su acción sobre el complejo I mitocondrial se ha empleado como modelo de la enfermedad de Parkinson debido a que la acumulación de daño oxidativo concluye con la apoptosis mediada por la caspasa-3 (Alarcón *et al.*, 2010). Los astrocitos evidenciaron cambios morfológicos relacionados a la apoptosis cuando fueron dosificados con rotenona a una concentración de 1  $\mu$ M (Fig. 11). Estos resultados pueden explicarse si se tiene en cuenta el contenido total de fenoles en cada extracto (Fig. 6, Tabla 3). Estudios previos han mostrado que los polifenoles son el grupo de compuestos derivados de vegetales más abundante en la dieta humana, dentro de los cuales destacan los flavonoides (Zhang *et al.*, 2010). Los flavonoides poseen varios grupos hidroxilo que les otorgan una gran actividad antioxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Los flavonoides pueden donar electrones y funcionar como scavengers de los radicales súper óxido ( $O_2^-$ ) que son formados en exceso por la mitocondria cuando el complejo I de la NADH deshidrogenasa está dañado por acción de la rotenona (Birt *et al.*, 2001; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Alarcón *et al.*, 2010). Los polifenoles mismos se convierten en radicales pero, debido a su estructura conjugada, el electrón remanente se vuelve relativamente inactivo (Birt *et al.*, 2001). La alta capacidad antioxidante de flavonoides como la catequina, epicatequina, quercetina y

procionidinas deriva de sus estructuras tipo catecol (Fig. 10) y de la capacidad de deslocalización de electrones (Martin *et al.*, 2011). Los flavonoides podrían entonces ejercer su acción directamente en la concentración de ROS en los astrocitos inactivando el exceso de radicales, y se cree que *in vivo* sucede una reacción similar puesto que los flavonoides son moléculas de bajo peso molecular con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Williams *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2009; Williams & Spencer, 2011).



**Figura 10. Esquema de un Flavanol.** Se muestra una estructura de un tipo común de flavanol y la configuración tipo catecol (sombreado amarillo). Otra característica importante es el anillo C insaturado (sombreado rojo) y el grupo funcional 4-oxo (sombreado verde). La molécula también podría tener propiedades quelantes para iones metálicos de transición como el cobre y el hierro (sombreado azul). Tomado de *Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules?* (Williams *et al.*, 2004).



**Figura 11. Astrocitos tratados con diferentes concentraciones de rotenona.** A Grupo control. B Astrocitos tratados con rotenona 100 nm. Se evidenció un gran número de células apoptóticas y pérdida considerable de la confluencia. C Astrocitos tratados con 500 nm de rotenona. Mayor número de células apoptóticas y gran parte de

ellas se despegaron. **D** Astrocitos tratados con rotenona 1  $\mu\text{M}$ . Casi todas las células se despegaron y se presentó bastante debris celular. Barra de escala= 100  $\mu\text{m}$ .

Sin embargo, el efecto protector de los extractos sobre los astrocitos podría no solo restringirse a la capacidad antioxidante de los flavonoides. A pesar de las características que hacen de los flavonoides compuestos con gran potencial antioxidante a nivel celular, la acción de éstos podría relacionarse a su influencia sobre vías de señalización intracelular puesto que *in vivo* se encuentran a bajas concentraciones, donde se ha demostrado que son capaces de cumplir funciones neuroprotectoras (Spencer *et al.*, 2009). Así pues, mantener la función de los complejos antioxidantes celulares se constituye como otra vía para mantener la viabilidad celular a pesar de encontrarse bajo estrés oxidativo. Se ha comprobado que algunos flavonoides tienen la capacidad de mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa así como promover la expresión de proteínas de las mismas enzimas mediante la activación de genes (Martín *et al.*, 2011). El estrés oxidativo tiene una marcada influencia en la activación de cascadas de señalización pro-apoptóticas, como la activación de la ruta MAP quinasa y de proteínas como la JNK. Así pues, como fue mencionado anteriormente, la inhibición de ciertas vías de señalización conlleva a la supervivencia celular impidiendo los procesos apoptóticos (Williams *et al.*, 2004).

El extracto de semilla de *V. labrusca* mostró una protección mayor de los astrocitos tratados con rotenona aunque no tan amplia respecto a los demás extractos. Se ha probado que los extractos de semilla de uva tienen efectos sobre la transcripción de proteínas, como la interleuquina-6 (IL-6), la cual está implicada en la protección neuronal ante diferentes tipos de estrés oxidativo (provocados por NO y ROS) (Fujishita *et al.* 2009). Metabolitos secundarios como el resveratrol regulan la activación de la transcripción del gen IL-6 por parte de los astrocitos (así como otras citoquinas y enzimas inflamatorias), cuyo producto protege a las células tratadas con un agente pro oxidante hasta un 20% (similar a los valores obtenidos en el ensayo con rotenona 1  $\mu\text{M}$ ) (Fujishita *et al.* 2009).

## **Conclusiones y Recomendaciones**

El presente estudio demostró que los extractos en metanol tienen mejor capacidad antioxidante respecto a los jugos, debido a que los extractos acuosos tienen sustancias interferentes como azúcares, ácidos orgánicos entre otros. Así mismo se evidenció que el método ABTS es más sensible y por ello los  $\text{IC}_{50}$  son más bajos respecto a los obtenidos por el DPPH. Se comprobó además la correlación que existe entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante. La semilla de *Vitis labrusca*, tanto en metanol como en acetato de etilo mostró la mayor actividad

antioxidante (DPPH y ABTS) así como el más alto contenido de fenoles totales. Al evaluar la dosis-respuesta de los extractos se observó un claro efecto sobre la proliferación de los astrocitos, especialmente en el extracto de semilla a 100 µg/ml, lo cual corrobora los resultados obtenidos en capacidad antioxidante. Al incluir un insulto con rotenona se comprobó que los extractos en general tienen la capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo.

Con base a los resultados obtenidos se recomienda hacer un fraccionamiento con una mayor cantidad de solventes y realizar una caracterización de los compuestos obtenidos. Además se recomienda ampliar el espectro de concentraciones utilizadas en las células con el fin de entender con mayor profundidad el comportamiento de los compuestos vegetales sobre la fisiología celular. Es necesaria la identificación taxonómica de los ejemplares botánicos utilizados como elemento de rigor y entendimiento del comportamiento de los extractos en su actividad biológica.

## **Bibliografía**

- ALARCÓN A, SANTAMARÍA A, KÖNIGSBERG M. Modelos neurotóxicos de la Enfermedad de Parkinson y Disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica* 2010; 29(3): 92-100.
- ANGIOSPERM PHILOGENY GROUP (APG). Angiosperms <http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/> Consultado el 5 de Noviembre de 2011.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1980.
- AHMADIAN S, BARAR J, SAEI A, FAKHREE M, OMIDI Y. Cellular toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell line: MTT assay. *Journal of Visualized Experiments* 2009; 26: 1-2.
- ARRANZ-MARTINEZ S. compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación y cuantificación. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2010, 177 p.
- BESERRA-ALMEIDA M, MACHADO-DE SOUSA P, CAMPOS-ARRIAGA A, MATIAS-DO PRADO G, DE CARVALHO-MAGALHÃES C, ARRAES-MAIA E, GOMES-DE LEMOS T. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 2011; 44: 2155-2159.



- BIRT D, HENDRICH S, WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and Isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 2001; 90: 157-177.
- BOLAÑOS J, MORO M, LIZASOAIN I, ALMEIDA, A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Advanced drug Delivery Reviews* 2009; 61: 1299-1315.
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M, BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technology/Food Science and Technology* 1995; 28: 25-30.
- CAO Q, WEI L, LU L, ZHAO C, ZHAO H & YANG H. Astrocytes protect MN9D neuronal cells against rotenone-induced oxidative stress by a glutathione-dependent mechanism. *Acta Physiologica Sinica* 2007; 59(3): 253-259.
- CATÁLOGO DE LA BIODIVERSIDAD DE COLOMBIA, Plantas: *Vaccinium meridionale* SW.  
<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=1603&method=displayA>  
AT Consultado el 5 de Noviembre de 2011.
- CHEN Y, VARTIAINEN N, YING W, CHAN P, KOISTINAHO J & SWANSON R. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry* 2001; 77: 1601-1610.
- CIRCU M, YEE-AW T. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 48: 749-762.
- DA SILVA G, GRACIELI F, COPETTI C, VALDEMIRO L, FETT R. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. *Food Research International* 2011; 44: 708-715.
- DANI C, OLIBONI L, AGOSTINI F, FUNCHAL C, SERAFINI L, HENRIQUES J, SALVADOR M. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro* 2010; 24: 148-153.
- DASTMALCHI K, OLLILAINEN V, LACKMAN P, BOIJE AF GENNÄS G, DORMAN D, JÄRVINEN P, YLI-KAUHALUOMA J, HILTUNEN R. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009; 17: 867-871.
- FARBOOD Y, SARKAKI A & BADA VI M. Preventive effect of grape seed hydroalcoholic extract on dementia type of Alzheimer's Disease in aged male rats. *International Journal of Pharmacology* 2009; 5 (4); 257-262.
- FU L, BO-TAO X, XIANG-RONG X, REN-YOU G, YUAN Z, EN-QUIN X, HUA-BIN L. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 2011; 129: 345-350.

- FUJISHITA K, OZAWA T, SHIBATA K, TANABE S, SATO Y, HISAMOTO M, OKUDA T, KOIZUMI S. Grape seed extract acting on astrocytes reveal neuronal protection against oxidative stress via Interleukin-6-mediated mechanisms. *Cellular Molecular Neurobiology* 2009; 29: 1121-1129.
- GARCÍA A, DE PASCUAL T, SANTOS C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food chemistry* 2004; 84: 13-18.
- GARZÓN G, NARVÁEZ C, RIEDL K, SCHWARTZ S. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chemistry* 2010; 122: 980-986.
- GAVIRIA-MONTOYA C, OCHOA-OSPINA C, SÁNCHEZ-MESA N, MEDINA-CANO C, LOBO-ARIAS M, GALEANO-GARCÍA P, MOSQUERA-MARTÍNEZ A, TAMAYO-TENORIO A, LOPERA-PÉREZ Y & ROJANO B. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas* 2009; 8(6): 519-528.
- GITE S, AGTE V, KARKAMKAR S & NILEGAONKAR S. Antioxidant activity of parent 'juice grape' varieties and their hybrids. *Current topics in nutraceutical research* 2010; 8 (2): 89-94.
- HENAO-CASTAÑO M. El corozo de teta o Corozo (*Bactris minor*). Universidad Nacional de Medellín. <http://www.unalmed.edu.co/~crsequed/COROZO.htm> Consultado el 19 de Noviembre de 2011.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT, Biocifras de Colombia en el mundo. <http://www.humboldt.org.co/iavh/component/k2/item/129-colombia-en-el-mundo> Consultado el 5 de Noviembre de 2011.
- JACKSON R. 2008. *Wine Science: Principles and Applications*. Tercera edición Elsevier. Burlington, USA. 2008, 770 p.
- KUSKOSKI M, ASUERO A, TRONCOSO A, MANCINI.FILHO J, FETT R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 2005; 25(4): 726-732.
- LIM Y, LIM T & TEE J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry* 2007; 103: 1003-1008.

- MARTIN S, GONZALES-BURGOS E, CARRETERO E, GOMEZ-SERRANILLOS P. Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chemistry* 2011; 128: 40-48.
- MARTINEZ-FLORES S, GONZALES-GALLEGO J, CULEBRAS J & TUÑÓN M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 2002; 17(6): 271-278.
- MECHA M, IÑIGO P, MESTRE L, HERNANGÓMEZ M, BORRELL J, GUAZA C. An easy and fast way to Obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A Beginners approach. *Nature Protocol Exchange* <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2051/#/references>. Consultado el 16 de Septiembre de 2011.
- MOLINA-QUIJADA D, MEDINA-JUÁREZ L, GONZÁLEZ-AGUILAR G, ROBLES-SÁNCHEZ R & GÁMEZ-MEZA N. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. *Journal of Food* 2010; 8: 57-63.
- MOLYNEUX P. The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2004; 26 (2): 211-219.
- MULLETT S & HINKLE D. DJ-1 deficiency in astrocytes selectively enhances mitochondrial Complex I inhibitor-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 2011; 117: 375-387.
- NEWMAN E. New roles for Astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences* 2003; 26(10): 536-542.
- PALADINO S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (*Vitis vinifera* L.) Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, 2007, 76 p.
- PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE (PNUMA), Grupo de Países Megadiversos. <http://www.pnuma.org/deramb/GroupofLikeMindedMegadiverseCountries.php> Consultado el 5 de Noviembre de 2011.
- PING-HSIAO S, YIN-CHING C, JIUNN-WANG L, MING-FU W, GOW-CHIN Y. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus*

- atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. Journal of Nutritional Biochemistry 2010; 21: 598-605.
- RACHE L & PACHECO J. Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). Acta Botanica Brasilica 2010; 24(4): 1086-1095.
  - RICE-EVANS C, MILLER N, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine 1997; 20 (7): 933-956.
  - SEIFRIED H, ANDERSONB D, FISHER E, MILNER J. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. Journal of Nutritional Biochemistry 2007; 18: 567-579.
  - SPENCER J, VAUZOUR D, RENDEIRO C. Flavonoids and Cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. Archives of Biochemistry and Biophysics 2009; 492: 1-9.
  - TEMBURNI MK, JACOB MH. New Functions for the glia in the Brain. Proceedings of the National Academy of Science 2001; 98 (7): 3631-3632.
  - TERRAL J, TAABRD E, BOUBY L, IVORRA S, PASTOR T, FIGUEIRAL I, PICQ S, CHEVANCE J, JUNG C, FABRE L, TARDY C, COMPAN M, BACILIERI R, LACOMBE T & THIS P. EVOLUTION AND History of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. Annals of Botany 2010; 105: 443-455.
  - TOBAR-REYES J, FRANCO-MORA O, MORALES-ROSALES E & CRUZ-CASTILLO J. Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. Revista de la Facultad de ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo 2009; 2: 127-137.
  - TOVAR-FRANCO J. Protocolo cultivos primarios de Neuronas y Astrocitos. Tesis de Doctorado. Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, 1994, 34 p.
  - TROPICOS DATABASE, Distribution (Country occurrence map). <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=40024699&tab=maps> Consultado el 5 de Noviembre de 2011.
  - TUMBAS V, CANADANOVIC-BRUNET J, CETOJEVIC-SIMIN D, CETKOVIC G, DILAS S, GILLE L. Effect of Rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. Journal of the science of food and agriculture 2011. DOI 10.1002/jsfa.4695.

- TYRAKOWSKA B, SOFFERS A, SZYMUSIAK H, BOEREN S, BOERSMA M, LEMAŃSKA, K, VERVOORT J, RIETJENS I. Teac antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. *Free radical Biology and Medicine* 1999; 27(11): 1427-1436.
- VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOLA J, CRONIN M, MAZURA M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 44–84.
- VILLEGAS, B.E. El Carambolo (*Averrhoa carambola*). En: *Especies Vegetales Promisorias*; Seminario regional. Universidad Nacional de Medellín; Facultad de Ciencias Agropecuarias; Departamento de Agronomía; Grupo de Especies Vegetales Promisorias. Medellín. 1998
- WILLIAMS R, SPENCER J, RICE-EVANS C. Flavonoids: Antioxidants or Signalling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 36(7): 838-849.
- WILLIAMS R, SPENCER J. Flavonoids, cognition and dementia: Actions, mechanisms, and potencial therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2011 Article in Press. 11 p.
- ZHANG J, STANLEY R, ADAIM A, MELTON L & SKINNER M. Free radical and cytoprotective activities of phenolic antioxidants. *Molecular nutrition and Food Research* 2006; 50: 996-1005.

## ANEXOS

### Anexo 1. Datos Dosis-Respuesta Astrocitos dosificados con los extractos

La proliferación de las células se expresó en Porcentaje de Viabilidad, en donde el Control representa el 100%. Las concentraciones de extracto empleadas fueron 10, 50 y 100 µg/ml % Viabilidad = (Absorbancia células tratadas \*100)/ Absorbancia células sin tratar. Las células sin tratar equivalen al control.

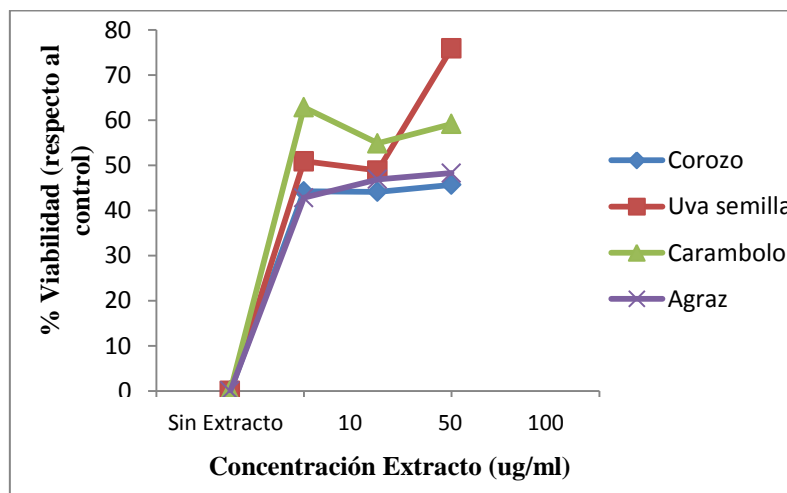
	% Viabilidad							
	<i>B. minor</i>				<i>V. Labrusca</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Control</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>10</b>	128	157,35	148,37	143,06	146,90	161,65	150	145
<b>50</b>	120	152,21	144,44	159,72	143,45	172,18	142,76	136,88
<b>100</b>	124,80	155,15	145,10	157,64	171,03	192,48	175,66	164,38

	% Viabilidad							
	<i>A. carambola</i>				<i>V. meridionale</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Control</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>10</b>	139,29	151,72	169,77	190,55	146,85	149,32	129,33	145,70
<b>50</b>	118,75	153,79	172,87	174,02	148,95	155,48	135,33	147,68
<b>100</b>	138,39	131,03	187,60	179,53	164,34	159,59	126,67	142,38

Se hizo un promedio general con el fin de graficar el porcentaje de Viabilidad. Se muestra la Desviación Estándar (SD) de los datos.

<i>Vitis semilla</i>	<i>Bactris minor</i>	<i>A. carambola</i>	<i>V. meridionale</i>
Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
100	100,0	100,0	100,0
144,19±12,30	150,89±7,47	162,83±22,32	142,80±9,10
144,09±17,23	148,82±15,85	154,86±25,80	146,86±8,41
145,67±14,93	175,89±11,99	159,14±28,55	148,24±17,20



**Figura Anexa 1. Porcentaje de Viabilidad respecto al control. Se observa cuanto aumenta la proliferación en porcentaje, donde el control equivale a 0 %**

## **Anexo 2.**

### **Anexo 2.a Datos Astrocitos Dosificados con Rotenona 1 $\mu$ M y las 3 concentraciones de los Extractos**

La proliferación de los astrocitos se expresó en Porcentaje de viabilidad empleando la misma ecuación  $\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia células tratadas} * 100) / \text{Absorbancia células sin tratar}$ , donde las células sin tratar equivalen al control sin rotenona.

<b>% Viabilidad</b>					
<b>Réplicas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Promedio+SD</b>
<b>Control Sin Rot</b>	100	100	100	100	100
<b>Control con Rot</b>	66,95	70,82	72,00	71,81	70,39 $\pm$ 2,35
<b>V. Labrusca</b>					
<b>10ug/ml</b>	80,08	84,55	87,56	81,06	83,31 $\pm$ 3,42
<b>50ug/ml</b>	88,56	90,13	96,44	97,36	93,12 $\pm$ 4,43
<b>100ug/ml</b>	83,47	92,27	92,44	91,19	89,85 $\pm$ 4,28
<b>B. minor</b>					
<b>10ug/ml</b>	83,90	89,27	91,11	94,27	89,64 $\pm$ 4,35
<b>50ug/ml</b>	82,63	84,12	93,33	95,15	88,81 $\pm$ 6,35
<b>100ug/ml</b>	80,51	91,42	95,56	88,11	88,90 $\pm$ 6,37
<b>A. carambola</b>					
<b>10ug/ml</b>	75,85	75,11	80,00	79,30	77,56 $\pm$ 2,44
<b>50ug/ml</b>	76,27	87,12	95,11	91,63	87,53 $\pm$ 8,19
<b>100ug/ml</b>	79,66	78,54	83,11	92,07	83,35 $\pm$ 6,13
<b>V. meridionale</b>					
<b>10ug/ml</b>	78,39	79,83	84,00	81,50	80,93 $\pm$ 2,41
<b>50ug/ml</b>	91,53	88,84	94,22	90,31	91,22 $\pm$ 2,28
<b>100ug/ml</b>	79,66	82,40	84,00	88,11	83,54 $\pm$ 3,53

La casilla de los promedios muestra en porcentaje cuanto mayor es la proliferación de los astrocitos respecto al control con rotenona y cuanto menor es respecto al control Sin rotenona.

Ninguno de los controles fue dosificado con extracto. El Porcentaje de viabilidad de los astrocitos dosificados con extracto y rotenona se calculó a partir del control sin rotenona. El Porcentaje de viabilidad del control con rotenona se calculó de la misma forma.

## **Anexo 2.b**

### **Aumento del % de Viabilidad celular respecto al control tratado con rotenona.**

La tabla muestra el porcentaje en el cual aumentó la proliferación de los astrocitos dosificados con los extractos respecto al control con rotenona 1  $\mu$ M, valores que fueron hallados con la ecuación  $\% \text{ Viabilidad} = \text{Astrocitos dosificados con extracto} - \text{Astrocitos dosificados con rotenona}$ .

Aumento de la Viabilidad Celular		
<b><i>Vitis Semilla</i></b>		
<b>10ug/ml</b>	<b>50ug/ml</b>	<b>100ug/ml</b>
12,92	22,73	19,45
<b><i>Bactris minor</i></b>		
<b>10ug/ml</b>	<b>50ug/ml</b>	<b>100ug/ml</b>
19,25	18,42	18,50
<b><i>Averrhoa carambola</i></b>		
<b>10ug/ml</b>	<b>50ug/ml</b>	<b>100ug/ml</b>
7,17	17,14	12,95
<b><i>Vaccinium meridionale</i></b>		
<b>10ug/ml</b>	<b>50ug/ml</b>	<b>100ug/ml</b>
10,54	20,83	13,15

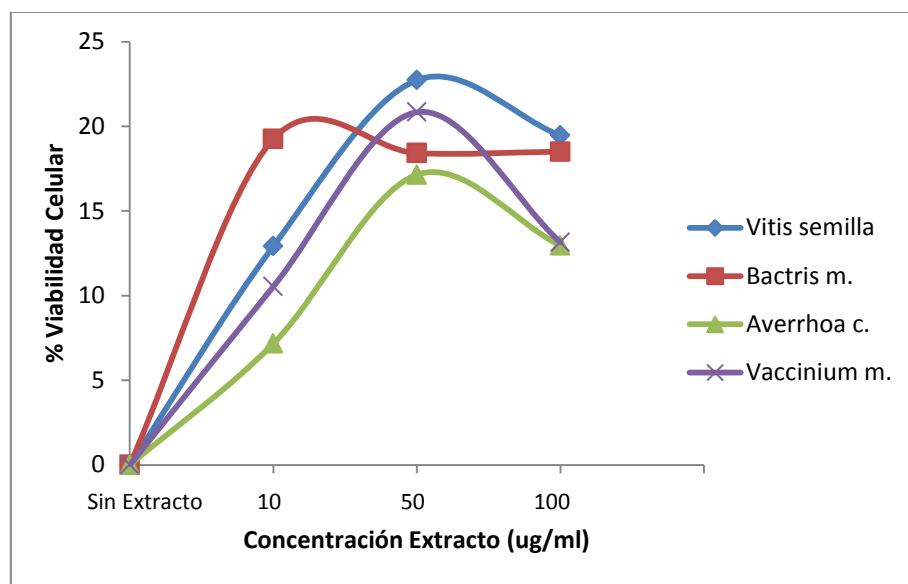


Figura Anexa 2.b. Porcentaje de Viabilidad respecto al control tratado con rotenona. Se observa cuanto aumenta la proliferación en porcentaje, donde el control equivale a 0 %.

### Anexo 3. Pruebas Estadísticas (ANOVA de una vía y prueba HSD de Tukey)

#### 3.a. Dosis-Respuesta Extractos

##### *Vitis labrusca*

##### One-way analysis of variance

P value	< 0,0001
P value summary	****
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	102,8
R square	0,9626

##### Summary

***	P<0,001
**	P<0,01
*	P<0,05
ns	No Significativo



<b>ANOVA Table</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>
Treatment (between columns)	0,02606	3	0,008686
Residual (within columns)	0,001014	12	0,00008448
Total	0,02707	15	

<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0,05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
Control vs Uva 10	-0,0745	16,21	Yes	***	-0,09380 to -0,05520
Control vs Uva 50	-0,07125	15,5	Yes	***	-0,09055 to -0,05195
Control vs Uva 100	-0,1115	24,26	Yes	***	-0,1308 to -0,09220
Uva 10 vs Uva 50	0,00325	0,7072	No	ns	-0,01605 to 0,02255
Uva 10 vs Uva 100	-0,037	8,051	Yes	***	-0,05630 to -0,01770
Uva 50 vs Uva 100	-0,04025	8,758	Yes	***	-0,05955 to -0,02095

### *Bactris minor*

#### **One-way analysis of variance**

P value	0,0208			
P value summary	*			<b>Summary</b>
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			*** P<0,001
Number of groups	4			** P<0,01
F	4,755			* P<0,05
R square	0,5431			ns No Significativo

<b>ANOVA Table</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>
Treatment (between columns)	0,01195	3	0,003984
Residual (within columns)	0,01005	12	0,0008378
Total	0,022	15	

<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0,05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
Control vs Corozo 10	-0,06225	4,301	Yes	*	-0,1230 to -0,001480
Control vs Corozo 50	-0,0625	4,319	Yes	*	-0,1233 to -0,001730
Control vs Corozo 100	-0,0645	4,457	Yes	*	-0,1253 to -0,003730
Corozo 10 vs Corozo 50	-0,00025	0,01727	No	ns	-0,06102 to 0,06052
Corozo 10 vs Corozo 100	-0,00225	0,1555	No	ns	-0,06302 to 0,05852
Corozo 50 vs Corozo 100	-0,002	0,1382	No	ns	-0,06277 to 0,05877

*Averrhoa carambola*

**One-way analysis of variance**

P value	0,0231		
P value summary	*		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	***	P<0,001
Number of groups	4	**	P<0,01
F	4,594	*	P<0,05
R square	0,5346	ns	No Significativo

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,01754	3	0,005846
Residual (within columns)	0,01527	12	0,001273
Total	0,03281	15	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Control vs Camabolo 10	-0,081	4,541	Yes	*	-0,1559 to -0,006106
Control vs Carambolo 50	-0,07175	4,023	Yes	*	-0,1466 to 0,003144
Control vs Carambolo 100	-0,0755	4,233	Yes	*	-0,1504 to -0,0006058
Camabolo 10 vs Carambolo 50	0,00925	0,5186	No	ns	-0,06564 to 0,08414
Camabolo 10 vs Carambolo 100	0,0055	0,3084	No	ns	-0,06939 to 0,08039
Carambolo 50 vs Carambolo 100	-0,00375	0,2102	No	ns	-0,07864 to 0,07114

*Vaccinium meridionale*

**One-way analysis of variance**

P value	< 0,0001		
P value summary	****		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	***	P<0,001
Number of groups	4	**	P<0,01
F	26,18	*	P<0,05
R square	0,8675	ns	No Significativo

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,01383	3	0,004612
Residual (within columns)	0,002114	12	0,0001761
Total	0,01595	15	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Control vs Agraz 10	-0,063	9,494	Yes	***	-0,09086 to -0,03514
Control vs Agraz 50	-0,069	10,4	Yes	***	-0,09686 to -0,04114

Control vs Agraz 100	-0,07075	10,66	Yes	***	-0,09861 to -0,04289
Agraz 10 vs Agraz 50	-0,006	0,9042	No	ns	-0,03386 to 0,02186
Agraz 10 vs Agraz 100	-0,00775	1,168	No	ns	-0,03561 to 0,02011
Agraz 50 vs Agraz 100	-0,00175	0,2637	No	ns	-0,02961 to 0,02611

### 3.b Rotenona+Extractos

#### V. Labrusca

##### One-way analysis of variance

P value	< 0,0001		
P value summary	****		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	5		
F	63,58		
R square	0,9443		

Summary	
***	P<0,001
**	P<0,01
*	P<0,05
ns	No Significativo

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,01069	4	0,002673
Residual (within columns)	0,0006305	15	0,00004203
Total	0,01132	19	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
No Rot vs Con Rot	0,06825	21,05	Yes	***	0,05409 to 0,08241
No Rot vs Uva 10+Rot	0,03775	11,65	Yes	***	0,02359 to 0,05191
No Rot vs Uva 50+Rot	0,016	4,936	Yes	*	0,001844 to 0,03016
No Rot vs Uva 100+Rot	0,02225	6,864	Yes	**	0,008094 to 0,03641
Con Rot vs Uva 10+Rot	-0,0305	9,409	Yes	***	-0,04466 to 0,01634
Con Rot vs Uva 50+Rot	-0,05225	16,12	Yes	***	-0,06641 to 0,03809
Con Rot vs Uva 100+Rot	-0,046	14,19	Yes	***	-0,06016 to 0,03184
Uva 10+Rot vs Uva 50+Rot	-0,02175	6,71	Yes	**	-0,03591 to 0,007594
Uva 10+Rot vs Uva 100+Rot	-0,0155	4,782	Yes	*	-0,02966 to 0,001344
Uva 50+Rot vs Uva 100+Rot	0,00625	1,928	No	ns	-0,007906 to 0,02041

#### *Bactris minor*

##### One-way analysis of variance

P value	< 0,0001
---------	----------

P value summary	****	<b>Summary</b>	
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	***	P<0,001
Number of groups	5	**	P<0,01
F	37,31	*	P<0,05
R square	0,9087	ns	No Significativo

<b>ANOVA Table</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>
Treatment (between columns)	0,009704	4	0,002426
Residual (within columns)	0,0009753	15	0,00006502
Total	0,01068	19	

<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0,05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
No Rot vs Con Rot	0,06825	16,93	Yes	***	0,05064 to 0,08586
No Rot vs Corozo 10+rot	0,024	5,953	Yes	**	0,006394 to 0,04161
No Rot vs Corozo 50+Rot	0,026	6,449	Yes	**	0,008394 to 0,04361
No Rot vs Corozo 100+Rot	0,02575	6,387	Yes	**	0,008144 to 0,04336
Con Rot vs Corozo 10+rot	-0,04425	10,98	Yes	***	-0,06186 to 0,02664
Con Rot vs Corozo 50+Rot	-0,04225	10,48	Yes	***	-0,05986 to 0,02464
Con Rot vs Corozo 100+Rot	-0,0425	10,54	Yes	***	-0,06011 to 0,02489
Corozo 10+rot vs Corozo 50+Rot	0,002	0,4961	No	ns	-0,01561 to 0,01961
Corozo 10+rot vs Corozo 100+Rot	0,00175	0,4341	No	ns	-0,01586 to 0,01936
Corozo 50+Rot vs Corozo 100+Rot	-0,00025	1	No	ns	0,00620 to -0,01786

### *Averrhoa carambola*

#### **One-way analysis of variance**

P value	< 0,0001	<b>Summary</b>	
P value summary	****	***	P<0,001
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	**	P<0,01
Number of groups	5	*	P<0,05
F	32,98	ns	No Significativo
R square	0,8979		

<b>ANOVA Table</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>
Treatment (between columns)	0,01051	4	0,002628
Residual (within columns)	0,00119	5	0,00007968
Total	0,01171	19	

<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0,05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
---	-------------------	----------	----------------------------------	----------------	-----------------------

No Rot vs Con Rot	0,06825	15,29	Yes	***	0,04876 to 0,08774
No Rot vs Carambolo 10+Rot	0,05175	11,59	Yes	***	0,03226 to 0,07124
No Rot vs Carambolo 50+Rot	0,029	6,497	Yes	**	0,009509 to 0,04849
No Rot vs Carambolo 100+Rot	0,0385	8,626	Yes	***	0,01901 to 0,05799
Con Rot vs Carambolo 10+Rot	-0,0165	3,697	Yes	**	-0,03599 to 0,002991
Con Rot vs Carambolo 50+Rot	-0,03925	8,794	Yes	***	-0,05874 to -0,01976
Con Rot vs Carambolo 100+Rot	-0,02975	6,666	Yes	**	-0,04924 to -0,01026
Carambolo 10+Rot vs Carambolo 50+Rot	-0,02275	5,097	Yes	*	-0,04224 to -0,003259
Carambolo 10+Rot vs Carambolo 100+Rot	-0,01325	2,969	No	ns	-0,03274 to 0,006241
Carambolo 50+Rot vs Carambolo 100+Rot	0,0095	2,128	No	ns	-0,009991 to 0,02899

### *Vaccinium meridionale*

#### One-way analysis of variance

P value	< 0,0001			
P value summary	****			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	142			
R square	0,9743			

Summary	
***	P<0,001
**	P<0,01
*	P<0,05
ns	No Significativo

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,01054	4	0,002634
Residual (within columns)	0,0002783	15	0,00001855
Total	0,01081	19	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
No Rot vs Con Rot	0,06825	31,69	Yes	***	0,05885 to 0,07765
No Rot vs Agraz 10+Rot	0,044	20,43	Yes	***	0,03460 to 0,05340
No Rot vs Agraz 50+Rot	0,02025	9,403	Yes	***	0,01085 to 0,02965
No Rot vs Agraz 100+Rot	0,038	17,65	Yes	***	0,02860 to 0,04740
Con Rot vs Agraz 10+Rot	-0,02425	11,26	Yes	***	-0,03365 to -0,01485
Con Rot vs Agraz 50+Rot	-0,048	22,29	Yes	***	-0,05740 to -0,03860
Con Rot vs Agraz 100+Rot	-0,03025	14,05	Yes	***	-0,03965 to -0,02085
Agraz 10+Rot vs Agraz 50+Rot	-0,02375	11,03	Yes	***	-0,03315 to -0,01435
Agraz 10+Rot vs Agraz 100+Rot	-0,006	2,786	No	ns	0,003404 to 0,008346
Agraz 50+Rot vs Agraz 100+Rot	0,01775	8,242	Yes	***	0,02715