

Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad citotóxica *In vitro* en la línea celular de fibrosarcoma HT1080

Autor:

Andrés Roberto Barrera Bugallo

Pontificia Universidad Javeriana.

Carrera 7 N° 40-62.

Tel: (571) 3208320.

Bogotá D.C. 2011

Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad citotóxica *In vitro* en la línea celular de fibrosarcoma HT1080

Autor:

Andrés Roberto Barrera Bugallo

Ingrid Schuler Ph. D

Bióloga

Decana académica

Andrea Forero

Bióloga

Directora de Carrera de Biología

Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad citotóxica *In vitro* en la línea celular de fibrosarcoma HT1080

Autor:

Andrés Roberto Barrera Bugallo

Luis Gonzalo Sequeda M.Sc. Sonia Luz Albarracín Cordero M.Sc. Ph.D

Químico

Director de tesis

Licenciada en Biología

Co-Director

Alba Noemí Téllez

Química

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

RESUMEN

El oxígeno diatómico (O_2) es una molécula imprescindible debido a que juega un papel fundamental en el metabolismo y el mantenimiento de la viabilidad celular. Sin embargo, este a su vez puede producir compuestos o especies reactivas ROS (del inglés Reactive Oxygen Species) que al acumularse en las células pueden producir diferentes patologías (Valko et al, 2007). Dado que los ROS son productos normales del metabolismo oxidativo, las células cuentan con sistemas antioxidantes endógenos enzimáticos como SOD, glutatión peroxidasa y catalasa (Valko et al, 2007), pero a veces no son suficientes y se hacen necesarios mecanismos exógenos. Existen moléculas naturales que parecen poseer capacidad antioxidante y por lo tanto pueden controlar los efectos causados por los ROS, estos compuestos se pueden encontrar en diferentes fuentes como alimentos especialmente en productos vegetales (García, 2004). En este estudio se evaluó la capacidad citotóxica y antioxidante de extractos de cuatro frutas de interés comercial carambolo (*Averrhoa carambola* L.), uva (*Vitis labrusca*), corozo (*Bactris minor*) y agraz (*Vaccinium meridionale*) con el fin de buscar una alternativa natural que proporcione sustancias antioxidantes capaces de reducir y prevenir los riesgos de enfermedades tumorales. Estas plantas se convierten en la alternativa natural de elección al poseer compuestos con alta capacidad antioxidante como los fenoles y polifenoles (Murillo, 2002). Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la capacidad antioxidante y posibles efectos antitumorales de extractos totales provenientes de estos frutos. Para esto, se empleó material vegetal de cada uno. Se utilizó un sistema de extracción en metanol. El potencial antioxidante se evaluó realizando un prueba preliminar de contenido de fenoles totales por medio del método desarrollado por Folin Cio Calteu, posteriormente se determinó la actividad antioxidante por dos métodos químicos, ABTS y DPPH. Luego se determinó la actividad biológica de los extractos sobre la línea celular HT1080 evaluando los efectos citotóxicos, los cuales se determinaron por porcentaje de viabilidad para esto se tomaron extractos en metanol de las cuatro frutas y se utilizaron concentraciones de 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, durante 48 horas. Por último, se determinó la actividad antioxidante a nivel celular

utilizando la línea HT1080 como modelo biológico y utilizando rotenona para causar estrés oxidativo en presencia del extracto durante 48 horas observando la viabilidad celular. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad antioxidante es mayor en los extractos en metanol con relación a los jugos tanto en estado líquido como liofilizado, el fruto que presentó la mayor capacidad antioxidante fue *Vitis labrusca* semilla tanto en el extracto en metanol como el extracto en acetato de etilo. A nivel celular no se encontró ningún efecto citotóxico. Se encontró un efecto antioxidante a nivel celular con los cuatro extractos.

Introducción

Los polifenoles, compuestos dentro de los que se destacan los flavonoides, las antocianinas, vitaminas entre otros, son metabolitos secundarios vegetales que han cobrado bastante importancia en la investigación alrededor de enfermedades como cáncer, cardiopatías, Enfermedad de Alzheimer, Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas debido al estrés oxidativo que precede a la aparición de las mismas (Valko *et. al*, 2007; Circu & Yee-Aw, 2010). Los compuestos fenólicos actúan como “scavengers” y como donadores de hidrógenos mediante lo cual pueden estabilizar a los radicales libres, aunque también existen claros indicios de que los polifenoles (especialmente los flavonoides) interactúan con diversas moléculas en rutas de señalización metabólicas, incidiendo directamente en la generación de cascadas de señalización mediante la cual se evidencian sus propiedades benéficas en relación a las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Birt *et. al*, 2001; Williams *et. al*, 2004). Los ROS participan en diferentes rutas metabólicas y son indispensables en el organismo (Seifried *et. al*, 2007). Pero, cuando se acumulan en exceso y los complejos enzimáticos corporales pierden la capacidad de degradarlos, se convierten en agentes patógenos generando daños celulares (Valko *et. al*, 2007)

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las especies reactivas ROS (del inglés Reactive Oxygen Species) son un grupo de radicales libres dotados de un electrón desapareado que le confieren propiedades paramagnéticas y como consecuencia una alta reactividad (González, 2009). Algunos ROS como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno resultan del proceso redox celular, y

de acuerdo a su concentración pueden traer beneficios a nivel celular como en las respuestas y la función inmunológica, o daños generando un estrés oxidativo, proceso nocivo que pueden dañar las estructuras celulares, incluyendo los lípidos, las proteínas y el ADN (González, 2009). El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas, tales como cáncer, trastornos autoinmunes, artritis reumatoide, cataratas, el envejecimiento, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Ebrahimzadeh, 2010). Es por esto, que se hacen necesarias defensas antioxidantes que neutralicen los ROS, manteniendo un equilibrio entre las especies reactivas y los antioxidantes. (González, 2009)

Para contrarrestar el estrés oxidativo se encuentran algunos compuestos que pueden ser producidos de forma endógena por las células u obtenidos exógenamente a través del consumo de alimentos y/o suplementos ricos en compuestos antioxidantes (Ebrahimzadeh, 2010). Estos compuestos actúan captando los radicales libres, previniendo y reparando los daños causados por los ROS, por lo tanto puede mejorar la defensa inmune y reducir el riesgo de cáncer y enfermedades degenerativas (Rengasagamy, 2010).

El uso de compuestos sintéticos antioxidantes ayuda a reducir el daño causado por los radicales libres. Sin embargo, la posible toxicidad, así como el rechazo de los consumidores en general, llevó a disminuir el uso de estos antioxidantes sintéticos y a consumir más fuentes de antioxidantes naturales (Ebrahimzadeh, 2010). Esta problemática ha generado en los últimos años un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes fitoquímicos, ya que pueden inhibir la propagación de reacciones de radicales libres, y a su vez proteger las células. Dentro de los compuestos con propiedades antioxidantes se encuentran los compuestos fenólicos como los flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, entre otros; estos compuestos se encuentran en fuentes naturales como los vegetales, las frutas, semillas etc. (Ebrahimzadeh, 2010).

En este trabajo se estudio la actividad antioxidante y citotóxica de 4 frutas carambolo (*Averrhoa carambola* L.), uva (*Vitis vinífera*), corozo (*Bactris minor*) y agraz (*Vaccinium meridionale*) frutos de alto consumo en Colombia, los cuales poseen compuestos fenolicos

y polifenólicos. (Gaviria 2009; Tobar 2009; Villegas 1998; Henao 2011) por lo tanto es posible que posea capacidad antioxidante, y antitumoral. La importancia de trabajar con esta fruta radica en que no se encuentran trabajos que relacionen directamente la capacidad antioxidante con el potencial antitumoral en la línea de cultivos celulares (células mesenquimales, neuronales, glioblastoma, fibrosarcoma y leucemia).

MARCO TEÓRICO

ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO ROS

Los radicales libres se pueden definir como las moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones no apareados en los orbitales atómicos o moleculares (Valko 2007). Este electrón desapareado puede llegar a tener un gran grado de reactividad. Entre la clase más importante de radicales libres generados en los sistemas vivos se encuentran los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) (Valko 2007).

El término de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) hace referencia a aquellos radicales libres y especies no radicales que participan en reacciones de elevación de agentes prooxidantes, los principales ROS son: Radical hidroxilo (OH^\cdot), Anión superóxido (O_2^-), Radical peróxido (ROO^\cdot), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), Óxido nítrico (NO), ozono etc. (Gonzales, 2009).

Los ROS son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas redox, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales y se forman por la reducción univalente del O_2 que produce el radical superóxido (O_2^-) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente, genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un RLO, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH^\cdot) que es varios miles de veces más reactivo que el O_2^- y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres. (Valko 2007; Simon 2000).

EFEECTO NOCIVO DE LOS ROS

El daño celular producido por las ROS afecta diferentes macromoléculas como los lípidos (ácidos grasos polinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas ya sea dañando su permeabilidad o oxidándolas y por lo tanto esto ocasiona la muerte celular; en las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc); en el ADN Ocurren mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos etc. (Rodríguez, 2000; Valko 2007).

SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan ROS. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen (Pérez 2000). A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre. El antioxidante, al reaccionar con un ROS le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un ROS débil no tóxico (la vitamina E). No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan substratos que a su vez reaccionan con los ROS (Perez 2000; Valko 2007).

Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y scavengers o eliminadores de radicales.

Enzimas:

La citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno. La superóxido dismutasa está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno. Catalasa y peroxidasas (glutación peroxidasa GPx) y glutación reductasa (GR) que neutralizan al H_2O_2 y lo convierten en agua. (Circu 2010)

Scavengers o eliminadores

La vitamina E o a tocoferol neutraliza al radical $\cdot OH$ por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante. La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el $O_2\cdot$ y con el $\cdot OH$, también es captor del oxígeno singlete y del ion hipoclorito. El glutación (GSH), además de captar el H_2O_2 como substrato de la GPx, también capta al $O_2\cdot$ y al $\cdot OH$. La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO.

Este sistema defensivo, que puede estar tanto en el citosol como en las membranas, no es totalmente efectivo, por lo que hay involucrada una segunda línea constituida por:

Sistemas reparadores de biomoléculas que reparan el daño producido al ADN y que pudieran propiciar trastornos genéticos o cancerígenos.

Sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados como las macroxiproteinasas y las endonucleasas. (Circu 2010)

DAÑO O ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno molecular O_2 se encuentra en su forma más estable como estado tripleta (unión de dos átomos de oxígeno por medio de un enlace covalente triple) que le confiere menor reactividad. No obstante por reacciones químicas, radiaciones ionizantes o por acción enzimática esta estabilidad puede cambiar y formarse especies químicas conocidos como radicales libres (ROS). Los ROS son especies moleculares con una alta reactividad.(Gonzales 2009)

El desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno ROS y la defensa antioxidante provoca el "estrés oxidativo" que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular.

El "estrés oxidativo" puede provenir de: Una deficiencia del sistema de defensa antioxidante. Un incremento de la formación de ROS cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica.

El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de esos cambios ocasiona la enfermedad.(Gastell 2000; Valko 2007)

Este estrés oxidativo puede generar alteraciones en la estructura y función de células, órganos y sistemas causando procesos patológicos tales como alteraciones cardiovasculares, desordenes neurológicos, diabetes, cáncer e incluso envejecimiento (González, 2009)

RELACIÓN ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

Dentro de las enfermedades que resultan de la oxidación celular se encuentra el cáncer, la cual es una de las principales causas mortalidad en el mundo; es el resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) cuya consecuencia es la degeneración de las células, que derivan en células precancerosas y finalmente tumores malignos (OMS, 2011).

El estrés oxidativo se a encontrado en varios tipos de cáncer ya que induce un desequilibrio redox celular que se ha descrito en varios tipos de células cancerígenas por lo tanto es posible que este relacionadas con el estimulo oncogénico. El primer paso es la permanente modificación del material genético resultante de los daños por oxidación que da como resultado el envejecimiento, mutagenesis, carcinogénesis. La mutacion del DNA es un paso critico en los niveles de la carcinogénesis ya que las elevadas lesiones oxidativas del DNA

se han observado en varios tumores. Hasta la fecha más de 100 daños del DNA producidos por ROS han sido identificados. ROS induce rupturas en el DNA de una o de doble hélice Purina, pirimidina, o modificaciones de desoxirribosa, estos daños pueden resultar en el arresto o la inducción de la transcripción, la inducción de la transducción de señales, errores de replicación, y inestabilidad genómica; los cuales están asociados con la carcinogénesis (Valko 2007)

Más de 150 estudios epidemiológicos evidencian que la ingesta de antioxidantes disminuye el riesgo de adquirir diversos tipos de tumores; una de las principales sustancias naturales antioxidantes que disminuye el riesgo de contraer cáncer es el betacaroteno (Rodríguez, 2000).

FIBROSARCOMA

Es un tumor mesenquimal maligno que deriva de los fibroblastos. Se trata de una neoformación de tipo nodular o infiltrativa que se puede presentar en cualquier localización. Histológicamente consta de células en huso o fusocelulares con núcleos de bordes romos y citoplasma alargado. Se observan abundantes mitosis y escaso pleomorfismo y anaplasia. Las células en huso están agrupadas al azar o bien en forma de fascículos o haces celulares que se entrecruzan formando ángulos agudos. Los fascículos fusocelulares se asocian a agrupamientos de colágena y fibras de reticulina que se visualizan adecuadamente con la tinción de tricrómico y de reticulina (Cipriano, 1998).

El Fibrosarcoma, es un cáncer agresivo y altamente metastasico del tejido conectivo que afecta a los huesos tubulares largos de niños y adultos. El diagnostico asociado a esta patología se puede atribuir a la metástasis agresiva propia de este cáncer y la falta de eficacia de los tratamientos preventivos y correctivos del tumor. Las primera etapa del fibrosarcoma es tratada con resección quirúrgica y posteriormente con radioterapia o quimioterapia. Sin embargo, aun después de operar tempranamente el fibrosarcoma, el tratamiento actual no es generalmente exitoso; la probabilidad de metástasis a partes distantes del cuerpo es mayor del 70% después del tratamiento quirúrgico.

La quimioterapia y la radio terapia son los tratamientos iniciales para la metástasis y el fibrosarcoma recurrente, sin embargo son inefectivos para la cura. Estos tratamientos no son celularmente específicos, sino que atacan a todas las células, destruyendo así tejido conectivo lo cual favorece la metástasis. Esto explica por qué individuos que han recibido radioterapia presentan un mayor riesgo de desarrollo de fibrosarcoma. Por otra parte, aunque el conocimiento sobre esta enfermedad ha evolucionado en los últimos 20 años, la supervivencia no ha cambiado, lo que indica que los métodos actuales de tratamiento han alcanzado su límite de eficacia. Estos datos sugieren la necesidad de nuevos tratamientos terapéuticos seguros y eficaces.

COMPUESTOS NATURALES Y FIBROSARCOMA

La degradación de la membrana basal por la matriz metaloproteinasas (MMP) es clave para la invasión potencial de las células cancerosas. La actividad de estas enzimas se ha demostrado que se correlaciona con la agresividad del tumor y la invasión del cáncer. Nutrientes, tales como lisina y ácido ascórbico actúan como inhibidores naturales de la Proteólisis ECM y, como tal, tienen el potencial de controlar el crecimiento tumoral y la expansión. Estos nutrientes ejercen su efecto antitumoral a través de la inhibición de las MMPs y el fortalecimiento de conectivo tejido que rodea las células cancerosas.

ALGUNOS ANTIOXIDANTES PROVENIENTES DE ESPECIES VEGETALES

Las plantas producen diferentes compuestos orgánicos que no participan de forma directa en el desarrollo y crecimiento de las mismas; estas sustancias son conocidas como metabolitos secundarios, y juegan un importante papel frente al estrés oxidativo.

Los polifenoles, son sustancias que se caracterizan por presentar un anillo aromático y un anillo benceno con uno o más grupos hidroxilados incluyendo derivados funcionales que son capaces de eliminar O_2 , O_2^- , $OH\cdot$, $NO\cdot$ y radicales libres alquilo y peroxilo, gracias a su capacidad de donar electrones, generando radicales fenoxilo estables; dentro de este grupo podemos encontrar sustancias de tipo no flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos,

taninos hidrolizables) y flavonoides (flavonas, Isoflavonas, flavonoles, flavanoles, antocianos, flavanonas, taninos condensados) (Manach et al., 2005).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos es de interés tecnológico y nutricional, debido a su procedencia de origen vegetal ya que podría contribuir a la disminución del uso de antioxidantes sintéticos que podrían traer consecuencias a futuro; además estas sustancias juegan un papel preventivo en diversas enfermedades crónicas no transmisibles como las enfermedades cardio-vasculares, cáncer entre otras patologías, así como en el proceso normal y patológico de envejecimiento.(Gonzales, 2009)

EL CARAMBOLO (*Averrhoa carambola* L.)

Por su gran variedad vegetal, Sudamérica se ha convertido en uno de los lugares de mayor interés para el estudio de la capacidad antioxidante de plantas medicinales. Hasta el momento se ha logrado determinar el principio activo y las propiedades farmacológicas de los compuestos de algunos frutos vegetales como es el caso del carambolo (*Averrhoa carambola* L.). 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 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).

A través de estudios químicos se ha podido determinar que este fruto posee un alto contenido de vitamina C, lo cual supone una potencial capacidad antioxidante (Desmarchelier & Ciccía, 1998). En un estudio realizado por la universidad de Panamá de 40 frutos incluyendo el carambolo se encontró que este contiene una cantidad de 192mg de compuestos fenólicos en 100g de fruta; en este mismo estudio se determinó que las frutas con más compuestos polifenólicos poseen mayor actividad antioxidante, pese a esto son pocos los estudios que reportan las bondades antioxidantes de este fruto (Murillo, 2002).

LA UVA (*Vitis labrusca*)

La uva, perteneciente a la familia *Vitaceae*, género *Vitis*, conforma un grupo de plantas de hábito arbustivo o lianas, las cuales se encuentran distribuídas en casi todo el mundo en

zonas de clima templado (Terral *et. al*, 2010; Tropicos Database). Dicha familia de plantas tiene una importancia comercial considerable en el mundo, donde se utilizan algunas especies como la *Vitis rupestris* o *Vitis riparia* como base para realizar injertos debido a su resistencia a patógenos, aunque el fuerte 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).

En los últimos años se han realizado diferentes estudios en donde se evidencian las bondades del consumo de antioxidantes naturales. En 1989 la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una investigación denominada proyecto Mónica, en el cual se determinó que Francia presentaba una tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular menor que otros países industrializados como Reino Unido y Estados Unidos; y que este resultado se encontraba directamente ligado al consumo de frutas y verduras pero sobretodo de vino. Los individuos escogidos para esta investigación tenían el hábito de consumir una dieta rica en grasas y por lo tanto tenían un riesgo elevado enfermedades cardiovasculares entre otras. De esta forma se comprobó que a pesar de practicar hábitos alimenticios perjudiciales los individuos presentaban un bajo índice de enfermedades cardiovasculares, de colesterol, cáncer, debido al tipo de dieta que llevaban basada en frutas, verduras y vino, alimentos particularmente ricos en compuestos fenólicos (Ramirez et al., 2009).

EL COROZO *Bactris minor*,

El *Bactris minor*, conocido como corozo o corozo de teta, 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 mas frecuencia en playas marinas. También se le encuentra en las sabanas de Córdoba, Bolivar y Sucre en terrenos con problemas de drenaje. Actualmente, es poca la bibliografía que reporta acerca de las propiedades de esta fruta por lo tanto es una fuente potencial de nuevo conocimiento.

EL AGRAZ *Vaccinium meridionale* SW

El agraz o *Vaccinium meridionale* SW. es una planta perteneciente a la familia *Ericaceae*, la cual se encuentra en Venezuela y Colombia, crece entre los 1800 y 3700 msnm. 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).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante y posibles efectos antitumorales de extractos totales de cuatro frutos de interés comercial en Colombia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la actividad antioxidante y determinar el contenido de fenoles totales de los extractos de los cuatro frutos mediante los métodos DPPH, ABTS y RFC.
2. Identificar los efectos de los extractos totales en la proliferación y supervivencia de la línea celular fibrosarcoma HT1080.
3. Caracterizar el potencial antioxidante de los extractos en la línea celular de fibrosarcoma HT1080.

METODOLOGÍA

Preparación de los extractos

UVA (*Vitis labrusca*)

Material Vegetal

Se colecto el material vegetal en el municipio de la Unión departamento del Valle del cauca. Se evaluó que no contuviera porciones en descomposición, y se trabajo con frutas maduras. Para evaluar la actividad antioxidante se prepararon 2 tipos de extracto: Jugo o zumo y extracto en solvente orgánico. se retiró la semilla. Se trabajaron la piel y la pulpa por separado.

Preparación de los extractos

- 1) Para la obtención de los jugos se pesaron 100 g de piel de la fruta fresca y 100 g de pulpa de la fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frio y el jugo obtenido se filtró y se almacenó a -20°C . 20 ml de jugo de piel y 20 ml de pulpa de uva se almacenaron en viales ámbar y se congelaron a -70°C para luego ser liofilizados por 24-48 horas.
- 2) Por otra parte se pesaron 100 g de piel de la fruta fresca y 100 g de pulpa de la fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frio con MeOH y se completo a un volumen de 200 ml con el mismo solvente. Se almacenaron aislados de la luz por 1 semana y posteriormente se filtraron en otro recipiente. Dicho filtrado se concentro en el rotaevaporóador. La parte destilada se almacenó en frascos ámbar, se congeló a -70°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 g 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. El producto destilado de cada fracción se congeló a -70°C y se liofilizó por 24-48 horas.

COROZO *Bactris minor*

Material Vegetal

Se colectó el material vegetal en el municipio de Montería departamento de Córdoba. Se evaluó que no contuviera porciones en descomposición, y se trabajó con frutas maduras. Para evaluar la actividad antioxidante se prepararon 2 tipos de extracto: Jugo o zumo y extracto en solvente orgánico. Se retiró la semilla. Se trabajó con piel-pulpa.

Preparación de los extractos

- 1) Para la obtención del jugo se pesaron 100 g de piel-pulpa de la fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frío y el jugo obtenido se filtró y se almacenó a -20°C . 20 ml de jugo de piel-pulpa se almacenaron en viales ámbar y se congelaron a -70°C para luego ser liofilizados por 24-48 horas.
- 2) Por otra parte se pesaron 100 g de piel-pulpa de la fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frío con MeOH y se completó a un volumen de 200 ml con el mismo solvente. Se almacenó aislado de la luz por 1 semana y posteriormente se filtró en otro recipiente. Dicho filtrado se concentró en el rotaevaporador. La parte destilada se almacenó en frascos ámbar, se congeló a -70°C y se liofilizó por 24-48 horas.

CARAMBOLO *Averrhoa carambola*

Material Vegetal

Se colectó el material vegetal en el municipio de La Unión departamento del Valle del Cauca. Se evaluó que no contuviera porciones en descomposición, y se trabajó con frutas

maduras. Para evaluar la actividad antioxidante se prepararon 2 tipos de extracto: Jugo o zumo y extracto en solvente orgánico. Se trabajo con el fruto completo.

Preparación de los extractos

- 1) Para la obtención del jugo se pesaron 100 g de fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frio y el jugo obtenido se filtró y se almacenó a -20°C . 20 ml de jugo se almaceno en viales ámbar y se congelo a -70°C para luego ser liofilizados por 24-48 horas.
- 2) Por otra parte se pesaron 100 g de fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frio con MeOH y se completo a un volumen de 200 ml con el mismo solvente. Se almaceno aislado de la luz por 1 semana y posteriormente se filtro en otro recipiente. Dicho filtrado se concentro en el rotaevaporóador. La parte destilada se almacenó en frascos ámbar, se congeló a -70°C y se liofilizó por 24-48 horas.

AGRAZ *Vaccinium meridionale*

Material Vegetal

Se colecto el material vegetal en el municipio de San miguel departamento de Boyacá. Se evaluó que no contuviera porciones en descomposición, y se trabajo con frutas maduras. Para evaluar la actividad antioxidante se preparo un extracto en solvente orgánico. Se trabajo con el fruto completo.

Preparación del extracto

- 1) Se pesaron 100 g de la fruta fresca. Después se llevó a cabo una maceración en frio con MeOH y se completo a un volumen de 200 ml con el mismo solvente. Se almaceno aislado de la luz por 1 semana y posteriormente se filtro en otro recipiente. Dicho filtrado se concentro en el rotaevaporóador. La parte destilada se almacenó en frascos ámbar, se congeló a -70°C y se liofilizó por 24-48 horas.

Caracterizar el potencial antioxidante de los extractos totales.

- Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método desarrollado por Folin Ciocalteu utilizado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos y se fundamenta en el carácter reductor que este posee.

Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico, 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, en viales protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Esto se realizó tomando respectivamente 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL y 100 µL de la disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L en viales ámbar de 3 mL, luego se adicionó a cada vial, 250 µL de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se agitó durante 5 min en el ultrasonido, posteriormente se adicionaron 250 µL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada vial, 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.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. 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 disoluciones y se mezclaron con 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregaron 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitaron fuertemente para luego, dejar 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.

- Determinación de actividad antioxidante por método ABTS:

El radical ABTS (2,2´azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico))

La obtención del radical ABTS se hizo a través de la reacción entre una tableta de ABTS 10 mg con persulfato de potasio, luego de la reacción se almaceno en ausencia de luz por 24 horas para estabilizar el radical. Una vez estuvo formado el radical ABTS se diluye con etanol hasta obtener una absorbancia entre 0,7 y 0,8 a una longitud de onda de 735.5nm.

Cada extracto se diluyo en diferentes volúmenes de etanol obteniendo concentraciones entre 50 y 5000 ppm. Luego cada dilución se tomo 20 microlitros del extracto y 980 microlitros del radical ABTS y se midió su absorbancia cada minuto y se realizaron curvas de tiempo vs absorbancia. Para conocer la capacidad antioxidante de los extractos se elaboro curvas estándar de antioxidantes conocidos como el acido ascórbico y un antioxidante sintético de referencia (Trolox).

- Determinación de actividad antioxidante por método DPPH:

Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizó el método basado en la molécula 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Éste método fue originalmente diseñado por Marsden Blois en 1958, y dentro de sus modificaciones posteriores destaca la de Brand-Williams *et. al* (1995), 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 ya que cuando la molécula se encuentra como radical es coloreada (violeta) y al reducirse pierde su color (Molyneux, 2004).

Para el protocolo desarrollado 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, en donde el radical tiene su máximo pico de absorción y por ende un comportamiento lineal de las absorbancias al mezclarse con el extracto, lo que permite que los datos sean más precisos (Molyneux, 2004).

Cada extracto se diluyo en diferentes volúmenes de etanol obteniendo concentraciones entre 50 y 5000 ppm. Luego cada dilución se tomo 20 microlitros del extracto y 980 microlitros del radical DPPH y se midió su absorbancia cada minuto y se realizaron curvas de tiempo vs absorbancia. Para conocer a capacidad antioxidante de los extractos se elaboro curvas estándar de antioxidantes conocidos como el acido ascórbico y un antioxidante sintético de referencia (Trolox).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

- Efecto Dosis-Respuesta de los extractos en en la línea celular HT1080

Las células HT1080 fueron expuestas a 3 diferentes dosis de los extractos de uva Isabella, corozo, carambolo y agraz a concentraciones de 10, 50 y 100 ug/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 cristales de formazan de color morado cuando ésta 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 HT 1080 en placas de 96 pozos (4000 células por pozo cuantificadas por hemocitometro) y se incubaron por 24 horas para que se adhieran completamente. Pasadas las 24 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 y se reemplazó con un volumen igual de medio nuevo sin rojo fenol (Se utilizan Sales de Earle [EBS] 2X suplementado con glucosa). Se adicionaron 10ul de la solución de MTT por pozo directamente al medio y se incubó por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación se retiró el medio que contiene el MTT y se adicionaron 100ul 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 $\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia células tratadas} * 100) / \text{Absorbancia células sin tratar}$ se cuantificó el porcentaje de proliferación respecto al control.

- Actividad antioxidante de los extractos en la línea celular HT1080 sometidos a estrés oxidativo.

Cultivos de fibrosarcoma HT1080 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 4000 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.** HT1080 dosificados con extracto a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y rotenona 1 μM . **B.** HT1080 dosificados con extracto concentrado a 50 $\mu\text{g/ml}$ y rotenona 1 μM . **C.** HT1080 dosificados con extracto concentrado a 100 $\mu\text{g/ml}$ 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 1 μM 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

En cada experimento se muestra el valor de la media y la desviación estandar (SD). Se utilizo el sofward grphpad prism versión 5 y se realizo una anova de una vía, seguida de la prueba HSD de tukey de comparaciones múltiples

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen, un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidroxilo incluyendo derivados funcionales (esteres, metil esterres, glicosido, etc) la naturaleza de los polifenoles varia desde moléculas simples como los acidos fenolicos hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos. Se presenta en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molecula de azúcar y un carbono aromatico. Por ello la forma mas común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicosidos siendo solubles en agua y solventes organicos.(Bravo 1998; Tsimidou 1998)

Como los compuestos fenolicos en su mayoría son altamente polares son solubles en agua pero la extracción con esta puede presentar desventajas como la co-extraccion de otros compuestos hidrosolubles difíciles de separar como los azucares, péptidos o enzimas, por lo tanto se hizo una extracción con metanol para tener un extracto total de polifenoles pero evitando la presencia de compuestos asociados que puedan producir cambios en la molécula originalmente presente.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

DETERMINACION DE FENOLES TOTALES

La concentración de fenoles totales presente en los extractos evaluados, se obtuvo remplazando los valores de absorbancia de estos en la ecuación de la recta de la curva de calibración de ácido gálico $y = 0,1172 + 0,0042x$ (Fig. 1), el resultado de fenoles totales obtenido se expresó en mg de Ácido Gálico/100 g de fruta (Tabla 1).

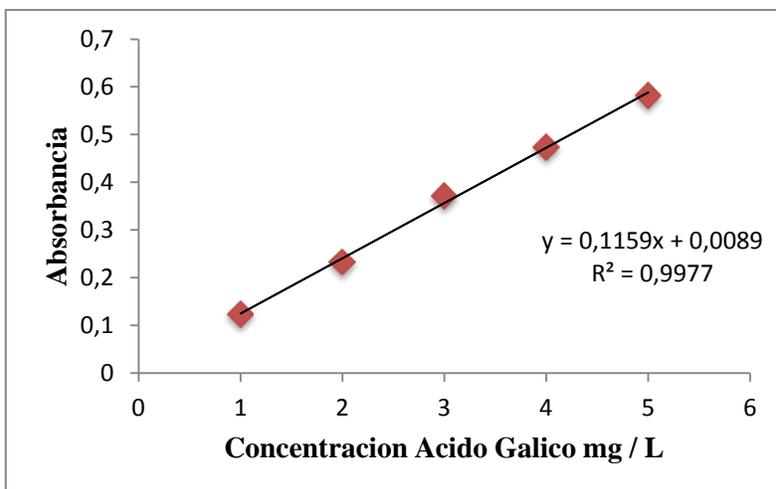


Figura 1. Curva de calibración Acido Gálico Se realizó la curva de calibración a partir de 5 concentraciones del ácido gálico (1mg/L, 2mg/L, 3mg/L, 4mg/L, 5mg/L), de la cual se obtuvo la ecuación de la recta y a partir de ella se reemplazan los valores de absorbancia de los extractos que han sido tratados con el reactivo de Folin.

Con esta curva se obtuvo la ecuación de la recta (Fig1) que permitió calcular las concentraciones de fenoles en las muestras, los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de fenoles totales expresados en mg de Ácido Gálico/100 gr de fruta.

Extracto*	(mg Acido 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 fueron liofilizados

Los extractos con mayor cantidad de fenoles totales son el *Vaccinium meridionale* con 86,05± 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), *Elaeis oleifera* con 78,11± 4,3 mg de ácido gálico/100 y la semilla de *Vitis labrusca* con 350,44± 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. 1), 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).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS ABTS Y DPPH

La actividad antioxidante se determinó por medio de los métodos ABTS y DPPH, los resultados se muestran en la Tabla 2.

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

Fruta	Extracto	ABTS	DPPH
		IC ₅₀ (ppm)	IC ₅₀ (ppm)
Uva Isabella	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
Carambolo	Jugo	6156,0±1281,1	11378,3±2513,6
	MeOH*	1708,1±27,1	2337,7±124,7
Corozo	Piel-Pulpa MeOH*	1174,8±62,5	3896,5±144,9
	Piel-Pulpa Jugo	1306,8±60,1	3973,3±486,6
Agraz	MeOH*	152,1±9,8	913,95±216,0
Controles	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.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad antioxidante es mayor en los extractos en metanol con relación a los jugos tanto en estado líquido como liofilizado, ya que al poseer un IC₅₀ bajo, se necesita una menor concentración del extracto para inhibir el 50% del radical (ABTS o DPPH).

El fruto que presenta el valor de IC₅₀ más bajo tanto para el extracto en metanol (132,6± 9,2 método ABTS y 367,6± 19,9 método DPPH) como para el extracto en acetato de etilo (138,2± 7,8 método ABTS y 298,5± 4,5 métodos DPPH) es *Vitis labrusca*.

Los extractos de *Averrhoa carambola* (jugo y metanol) presentan valores muy diferentes entre sí, con un IC₅₀ de 6156± 1281,1 por ABTS y 11378,3± 2513,6 por DPPH para el jugo y 1708,1± 27,1 por ABTS y 2337,7± 124,7 por DPPH para el extracto en metanol.

En cuanto al fruto *Bactris minor* no se evidencia una diferencia significativa en los valores de IC₅₀ obtenidos para los extractos en metanol (1174,8± 62,5 método ABTS y 3896,5± 144,9 método DPPH) y el jugo (1306,8± 60,1 método ABTS y 3973,3± 486,6 método DPPH).

Por otra parte, el extracto en metanol de *Bactris minor* con IC₅₀ de 1174,8± 62,5 (ABTS) y 3896,5± 144,9 (DPPH) no presenta mayores diferencias en la capacidad antioxidante respecto al jugo, cuyos IC₅₀ son 1306,8± 60,1 (ABTS) y 3973,3± 486,6 (DPPH) (Fig. 2.A). Estos resultados podrían deberse a que el fruto se compone en su mayoría de semilla, y tanto piel como pulpa no poseen una gran cantidad de líquido, además el color predominante de la pulpa utilizada era pálido, indicio de una cantidad reducida de polifenoles (García *et al.*, 2004). Se observa una diferencia significativa en los valores de IC₅₀ del extracto en metanol de *Vaccinium meridionale* entre los métodos DPPH (913,95± 216) y ABTS (152,1± 9,8).

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, Tabla 2), 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*, *Elaeis oleifera*, *Vitis labrusca*) tienen una mayor cantidad de fenoles respecto a los frutos de colores pálidos (como el carambolo) (Tabla 2), razón por

la cual también se relacionan dichos frutos oscuros como potentes antioxidantes (García *et al.*, 2004).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para los ensayos celulares se utilizó una línea de fibrosarcoma HT1080 obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD), esta línea de fibrosarcoma se multiplica rápidamente y continuamente ya que han perdido la inhibición por contacto. Aparentemente no hay ninguna disminución en el crecimiento de esta línea celular aun si es sembrada en bajas densidades. El tiempo de duplicación en la placa es de 26 horas.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS EN LA LÍNEA CELULAR HT1080

Para la determinación de la actividad citotóxica se emplearon diferentes concentraciones de los extractos 10ug/ml, 50ug/ml y 100mg/ml. Estas concentraciones se escogieron basados en los estudios previos de Matsuda *et. al* 2006 en las a encontraron una dosis respuesta de extracto completo en metanol en concentraciones entre 0 y 100 ug/ml y estudios de Sonoda *et. al* que muestra actividad citotóxica en células HT1080 en concentraciones entre 3,7ug/ml a 50 ug / ml. (Matsuda 2006; Sonoda 2003).

Para todos los ensayos se sembraron las células se dejaron adherir durante 24 horas y se colocó el extracto durante 48, terminado este tiempo se leyó por MTT.

Las células fueron mantenidas a 37°C, 10% de humedad, Y 5% CO₂.

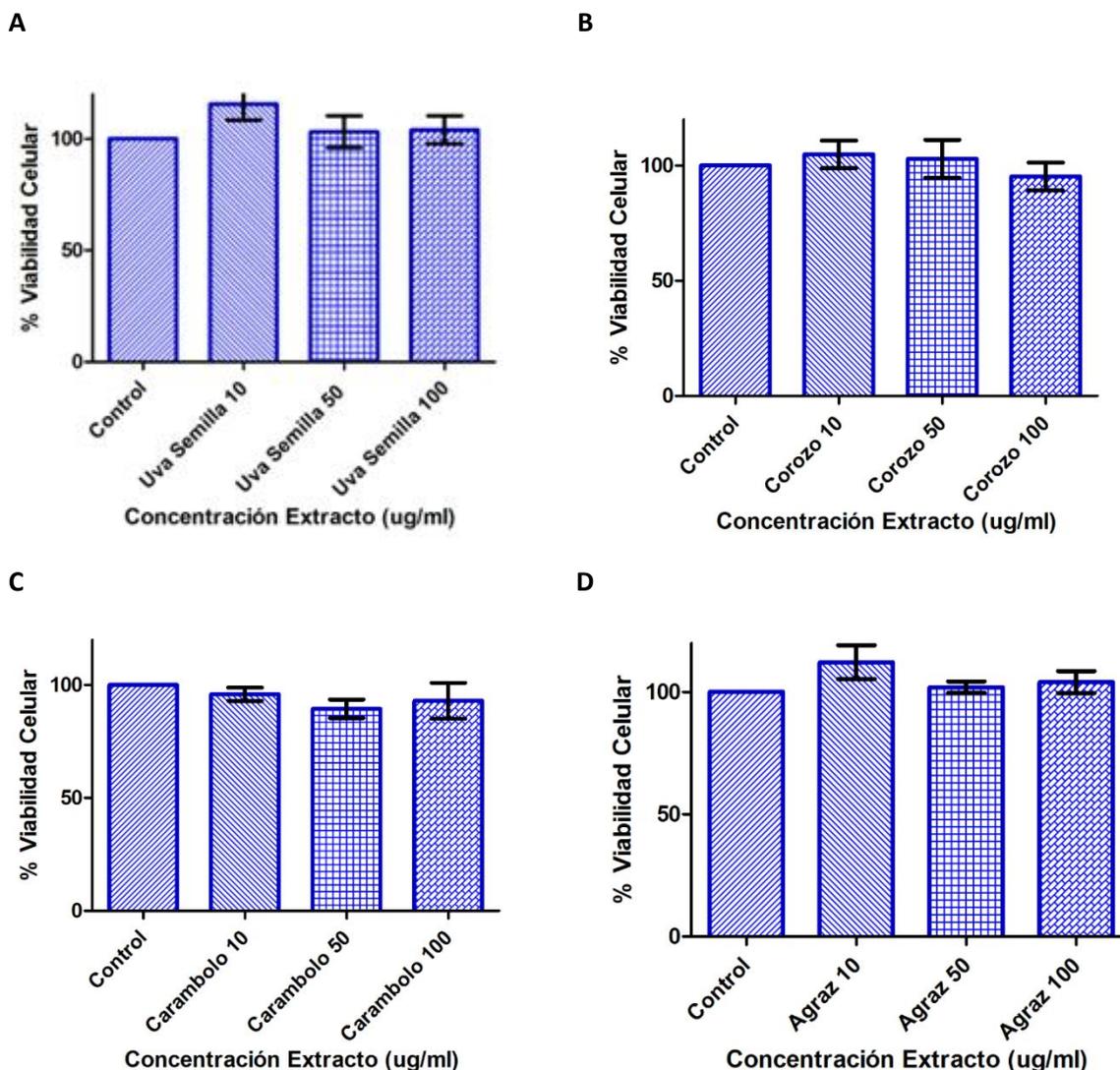


Figura 2: Citotoxicidad de los 4 extractos. La citotoxicidad se expresa en porcentaje de viabilidad de la línea celular HT1080 tratados respecto al control, el cual consiste en células sin tratamiento se realizaron 3 replicas del ensayo cada una con $n=4$. **A** Las tres concentraciones del extracto de *Vitis labrusca* no mostraron citotoxicidad de la línea celular HT1080 respecto al control ($ns P>0,05$). **B** Las tres concentraciones del extracto de *Bactriz minor* no mostraron citotoxicidad de la línea celular HT1080 respecto al control ($ns P>0,05$). **C** Las tres concentraciones del extracto de *Averrhoa carambola* mostraron citotoxicidad de la línea celular HT1080 respecto al control ($ns P>0,05$). **D** Las tres concentraciones del extracto de *Vaccinium meridionale* no mostraron citotoxicidad de la línea celular HT1080 respecto al control ($ns P>0,05$). Todos los valores de significancia se estimaron sobre los datos crudos de absorbancia mediante la prueba HDS de Tukey.

Los resultados de las curvas dosis respuesta para los extractos no muestran actividad citotóxica en ninguno de los tratamientos (Figura 2).

Esto se puede explicar ya que es posible que en los cuatro extractos trabajados hayan compuestos con actividad citotóxica pero por las bajas concentraciones y por esto no se aprecie en los resultados una actividad frente la Línea celular HT1080 por lo que se recomienda hacer un barrido en concentraciones más altas del extracto completo. Adicionalmente se recomienda realizar un fraccionamiento de los extractos y una caracterización de estos con el fin de hacer los ensayo con fracciones enriquecidas de polifenoles de diferentes polaridades.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS A NIVEL CELULAR

Como los cuatro extractos no presentaron actividad citotóxica frente a la línea celular HT1080, pero se comprobó que presentaban una actividad antioxidante se elaboro un ensayo de efecto antioxidante a nivel celular.

Se utilizo la línea celular HT1080 como modelo biológico celular y un compuesto derivado de raíces de especies de plantas tropicales *Derris* y *Lonchocarpus*, que se utiliza en todo el mundo como plaguicidas e insecticidas naturales llamado rotenona el cual es una isoflavona, que debido a su extrema capacidad lipofílica atraviesa fácilmente las membranas biológicas y no depende de transportadores de membrana. Este compuesto es ampliamente conocido como inhibidor de la NADH deshidrogenasa, o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial; al inhibir el complejo I mitocondrial se generan radicales libres como el superóxido, oxígeno molecular singlete, radicales peróxido; que al acumularse genera un estrés oxidativo. (Aguilar, 2010). La acumulación de daño por estrés oxidativo causado por rotenona conduce a la apoptosis dependiente de caspasa-3. (Aguilar, 2010; Hebert 2006).

Para el ensayo de actividad antioxidante a nivel celular de los extractos lo primero que se elaboro fue una curva de dosis respuesta con rotenona con cinco diferentes concentraciones 100nM, 500nM, 1uM, 5uM, 10uM.

Para la curva dosis respuesta se sembraron placas de 96 pozos con 4000 células por pozo se dejo que se adhirieran durante 24 horas; una vez adheridas se les dosificó con rotenona 100nM, 500nM, 1uM, 5uM, 10uM durante 48 horas. Lo primero que se hizo fue analizar los cambios en la morfología celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de rotenona, se utilizo la microscopia de luz (figura 3). Las células del

control presentaron la típica morfología de de la línea celular HT1080. Células ovoides con núcleo pequeño, citoplasma claro rodeado de fibras de colágeno hialinas y proyecciones laterales (figura 7a). En estado de confluencia estas células crecieron en múltiples capas y formando microtumores a través del pozo (figura 3a). (Rasheed, 1974). En las células dosificadas con rotenona 100nM, 500nM, 1uM, 5uM, 10uM se pudieron observar cambios morfológicos típicos de la apoptosis como la condensación citoplasmática, desarrollo de vacuolas citoplasmática y aparición de fragmentos celulares. (figura 3 b,c,d,e,f.).Observándose un menor daño celular en las de menor concentración 100nM y 500nM (figura 3 b,c) en la que todavía se observa una densidad de células formando microtumores con proyecciones laterales aunque se comienza a observar vacuolas citoplasmáticas que indican comienzo de la apoptosis. En las concentraciones de 1uM, 5uM, y 10uM (figura 3 d, e, f) ya no se observa la densidad de células que forman microtumores las proyecciones celulares no se pueden apreciar claramente hay presencia de vacuolas citoplasmáticas y se observa gran cantidad de residuos celulares lo que indica que hay una gran cantidad de células muertas sugiriendo que la rotenona desencadenó la muerte celular programada en las células de fibrosarcoma HT1080.

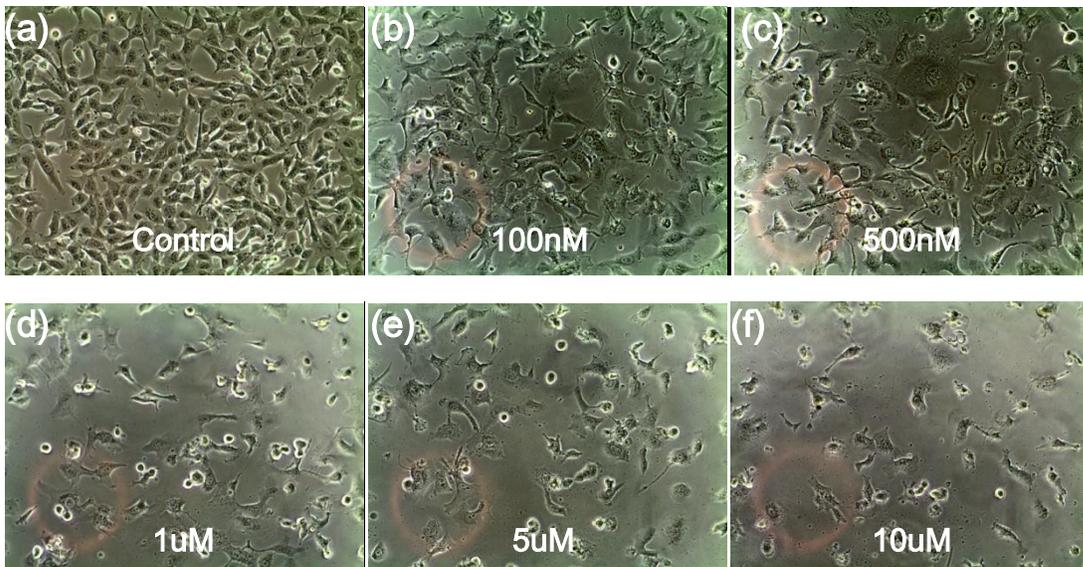


Figura 3. Efecto a nivel celular de Rotenona a diferentes concentraciones. Las figuras muestran el efecto de diferente concentraciones de rotenona a nivel celular nótese la aparición de vesículas en

las células dosificadas y una disminución de células entre las de menor y mayor concentración y estas comparadas con el control.

Para escoger la concentración de trabajo de rotenona se leyó el ensayo por MTT para observar el porcentaje de viabilidad celular en las diferentes concentraciones de rotenona (figura 4).

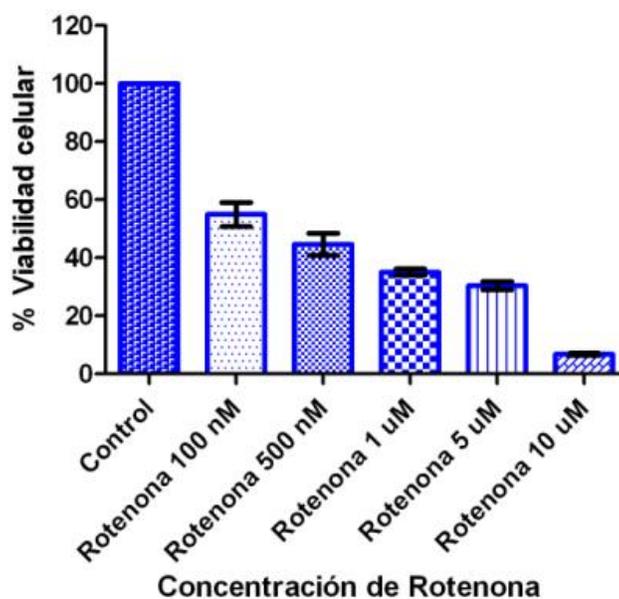


Figura 4 Curva dosis respuesta rotenona

En la curva de dosis respuesta de rotenona se observa una diferencia en el porcentaje de viabilidad celular desde la menor concentración 100nM de rotenona pero utilizamos como dosis para el ensayo la concentración de 1uM de rotenona puesto que para ver un resultado con el extracto se espera que la concentración de rotenona utilizada tuviera un porcentaje de viabilidad celular por debajo del 40%. (Figura 4).

Una vez se conoció la concentración de trabajo de rotenona se sembraron placas de 96 pozos con 4000 células por pozo se dejó que se adhirieran durante 24 horas; una vez adheridas se les dosificó con el extracto durante 48 horas al término de estas se dosificó con rotenona 1uM durante 48 horas esta dosis se estandarizó mediante una curva patrón de rotenona (figura 8).

Una vez dosificada se dejaron las células con rotenona y extracto durante 48 horas y se observó su viabilidad por medio de MTT. (figura 5)

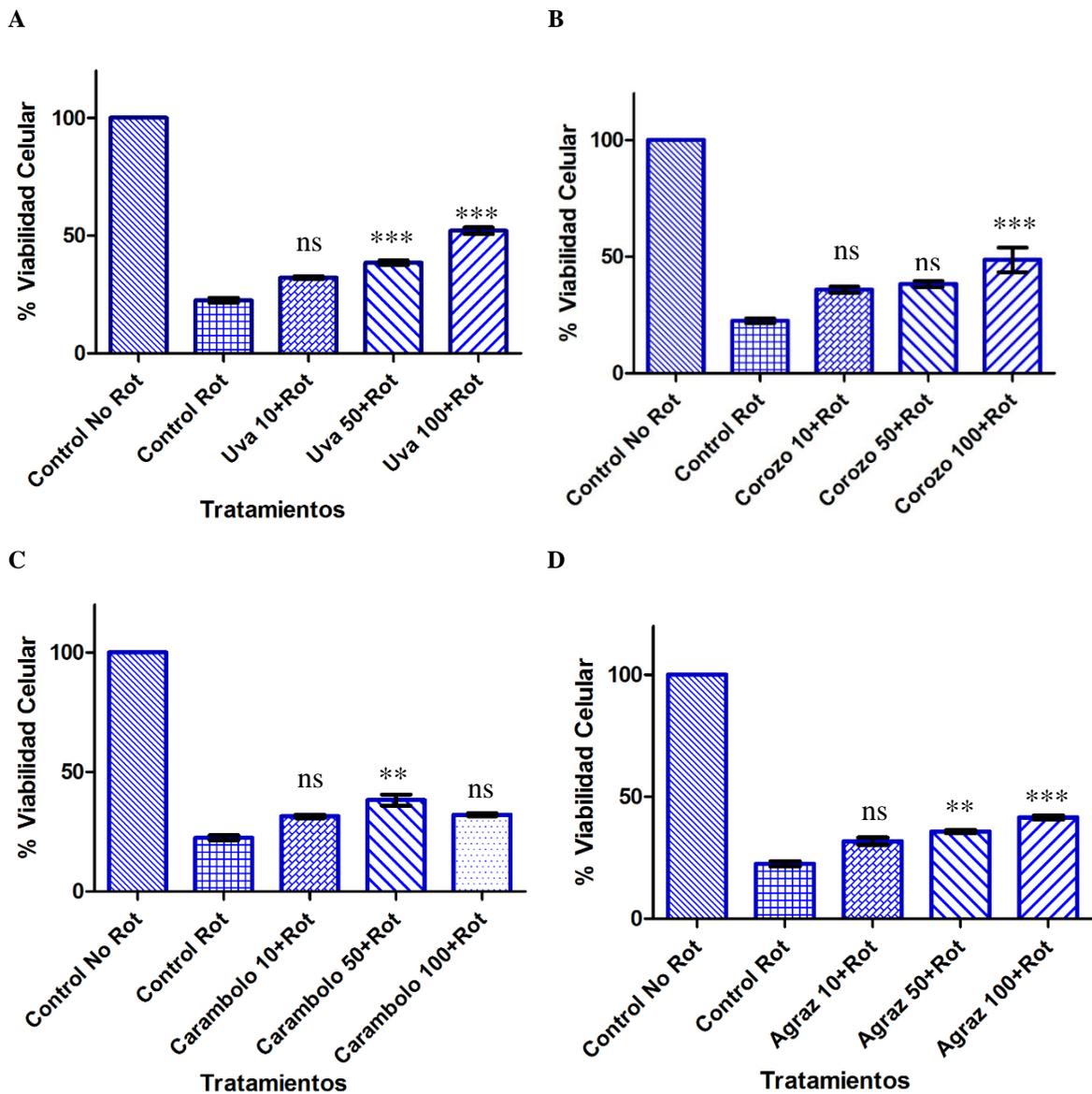


Figura 5. Efecto antioxidante a nivel celular. Se muestra el efecto de los extractos sobre la línea HT1080 tratados con Rotenona 1 μ M se expresa en porcentaje de viabilidad respecto al control sin rotenona el cual consiste en Células HT1080 sin tratamiento. Se utilizó un control de células sin ningún tratamiento para expresar el 100% de viabilidad. Se realizaron 3 réplicas del ensayo cada una con $n=4$. Todos los controles tratados con Rotenona muestran una diferentes a los controles sin Rotenona (** $P < 0,001$) **A** Las células HT1080 dosificada con las concentraciones 50 μ g/ml y 100 μ g/ml de extractos de *Vitis labrusca* evidencian un mayor porcentaje de viabilidad respecto de los que fueron tratados con Rotenona 1 μ M sin extracto (** $P < 0,001$) mientras que las tratadas con una concentración de 10 μ g/ml no presentan ninguna diferencia con el control con rotenona sin extracto (ns $P > 0,05$). Entre las concentraciones de 10 μ g/ml, 50 μ g/ml y 100 μ g/ml se evidencia un aumento de la proliferación entre ellos (** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$). **B** Las células HT1080 dosificada con las concentraciones 100 μ g/ml de extractos de *Bactriz minor* evidencian un mayor porcentaje de viabilidad respecto de los que fueron tratados con Rotenona 1 μ M sin extracto (** $P < 0,001$) mientras que las tratadas con una concentración de 10 μ g/ml y 50 μ g/ml no presentan ninguna diferencia con el control con rotenona sin extracto (ns $P > 0,05$). Entre las concentraciones de 10 μ g/ml, 50 μ g/ml y 100 μ g/ml se evidencia una diferencia en el porcentaje de viabilidad entre la concentración de 10 μ g/ml y 100 μ g/ml aumento de la proliferación entre

ellos (*P<0,05). **C** Las células HT1080 dosificada con las concentraciones 50 ug/ml de extractos de *Averrhoa carambola* evidencian un mayor porcentaje de viabilidad respecto de los que fueron tratados con Rotenona 1 uM sin extracto (**P<0,01) mientras que las tratadas con una concentración de 10 ug/ml y 100ug/ml no presentan ninguna diferencia con el control con rotenona sin extracto (ns P>0,05). Entre las concentraciones de 10ug/ml, 50ug/ml y 100ug/ml se evidencia una diferencia en el porcentaje de viabilidad entre la concentración de 10ug/ml y 50ug/ml y entre 50ug/ml y 100ug/ml aumento de la proliferación entre ellos (**P<0,01;*P<0,05). **D** Las células HT1080 dosificada con las concentraciones 50 ug/ml y 100 ug/ml de extractos de *Vaccinium meridionale* evidencian un mayor porcentaje de viabilidad respecto de los que fueron tratados con Rotenona 1 uM sin extracto (**P<0,01; ***P<0,001) mientras que las tratadas con una concentración de 10 ug/ml no presentan ninguna diferencia con el control con rotenona sin extracto (ns P>0,05). Entre las concentraciones de 10ug/ml, 50ug/ml y 100ug/ml se evidencia una diferencia en el porcentaje de viabilidad entre la concentración de 10ug/ml y 50ug/ml y entre 10ug/ml y 100ug/ml aumento y entre 50ug/ml y 100 ug/ml de la proliferación entre ellos (*P<0,05;***P<0,001;**P<0,01). Todos los valores de significancia se estimaron sobre los datos crudos de absorbancia mediante la prueba HDS de Tukey.

Los resultados (figura 5) muestran que existe un efecto antioxidante celular ya que al dosificarlas con la rotenona se daño el complejo I mitocondrial por lo que se esperaría una muerte celular por apoptosis debido a la concentración de radicales libres en la celula, generando un estrés oxidativo que da como resultado apoptosis (Ranjita et al. 2004). Pero en presencia de los extractos se observó que hay un porcentaje mayor de células viables frente al control (figura 5); con todos los extractos en todas las concentraciones, teniendo un efecto protector a mayores concentraciones de extracto en este caso la mayor protección se dio a una concentración de 100ug/ml de todos los extractos. El extracto que dio una mayor efecto antioxidante a nivel celular fue la uva con una protección del $29,56\% \pm 2,81$ (fig 5), seguido por el corozo $26,13\% \pm 10,45$ agraz $19,00\% \pm 1,62$ carambolo $9,69\% \pm 1,21$ lo que demuestra que el extracto completo con una actividad antioxidante puede tener un efecto a nivel celular contra el estrés oxidativo.

Esto demuestra que los fenoles podrían inhibir los daños generados por el estrés oxidativo (Martinez 2002) afirma que los flavonoides y las isoflavonas protegen contra el daño oxidativo por que químicamente los flavonoides y las isoflavonas son donadores de electrones y pueden tener una función antioxidante en cultivos celulares mediante la captación de aniones superóxido, oxígeno molecular singlete, radicales peróxido y/o estabilizando los radicales libres involucrados en procesos oxidativos. En este proceso los flavonoides se convierten en radicales libres pero su estructura conjugada hace que el electrón restante quede relativamente inactivo.

Conclusiones

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.

Los extractos en metanol tienen una mayor actividad antioxidante que los jugos ya que estos pueden presentar una menor interferencia al estar aislados de otros compuestos presentes en las plantas.

Existe una relación entre la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos medido por RFC y la capacidad antioxidante medida por DPPH y ABTS. Los compuestos que presentaron un mayor contenido de fenoles totales presentaron una mayor capacidad antioxidante.

Los extractos no presentaron una capacidad citotóxica contra la línea celular HT1080.

Se encontró una actividad antioxidante a nivel celular y se puede relacionar con el contenido de fenoles totales medida por RFC y la capacidad antioxidante ABTS y DPPH sugiriendo que extractos que posean compuestos fenólicos y actividad antioxidante pueden presentar una protección celular contra especies reactivas del oxígeno.

Recomendaciones.

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.

Se recomienda utilizar concentraciones mayores de los extractos con el fin de encontrar una dosis letal 50 del extracto. Se recomienda caracterizar los extractos y utilizar fracciones con el fin de encontrar moléculas citotóxicas dentro de los extractos contra la línea celular HT1080.

Se recomienda hacer el mismo ensayo de actividad antioxidante en células normales.

BIBLIOGRAFÍA

ALARCÓN AGUILAR, ADRIANA; SANTAMARÍA DEL ÁNGEL, ABEL; KÖNIGSBERG FAINSTEIN, MINA. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*, 2010; 29, 92-100.

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.

BIRT D, HENDRICH S, WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and Isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 2001; 90: 157-177.

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.

BRAVO L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56:317-333.

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.

CIRCU M, YEE-AW T. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 48: 749-762.

CIPRIANO A. Tumores cardíacos (II). Tumores primitivos malignos. Tumores metastásicos. Tumor carcinoide. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 103-114.

DESMARCHELIER C, CICCIA G. Antioxidantes de origen vegetal. *Ciencia Hoy*. <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy44/antiox3.htm>. Consultado el 5 de Abril de 2011.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS] (2011). *Cáncer*. Nota descriptiva No. 297. Documento revisado el 7 de enero de 2011, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>

EBRAHIMZADEH M, NABAVI S, NABAVI S, BAHRAMIAN F, BEKHRADNIA A. Antioxidant And Free Radical Scavenging Activity Of *H. Officinalis* L. Var. *Angustifolius*, *V.Odorata*, *B. Hyrcana* And *C. Speciosum*. *Pakistan Journal Of Pharmaceutical Sciences* 2010; 23 (1): 29-34

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.

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.

GONZÁLEZ M L, MUÑIZ P, VALLS V. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. *Centro de información: Cerveza y salud* 2009.

HEBERT LUIS HERNÁNDEZ MONTIEL. Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de parkinson; *Bioquímica*, 2006; 31, 146-158.

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 10 De Noviembre De 2011.

HISASHI MATSUDA, KAZUTOSHI YOSHIDA, KATSUTOSHI MIYAGAWA, YASUNOBU ASAO, SAYA TAKAYAMA, SOUICHI NAKASHIMA, FENGMING XU AND MASAYUKI YOSHIKAWA. Rotenoids and flavonoids with

anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15. 2007; 1539–1546.

MARTINEZ-FLORES S, GONZALES-GALLEGO J, CULEBRAS J & TUÑÓN M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 2002; 17(6): 271-278.

MAKI SONODA, TADASHI NISHIYAMA, YOSHIZUMI MATSUKAWA, MASATAKA MORIYASU. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91 65–68

MANACH E, WILLIAMSON G, MORAND C, SEAL A, REMESY C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:230S-242S.

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.

MURILLO E. Actividad antioxidante de Bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Universidad de Panamá, instituto de Alimentación y nutrición 2002.

OSORIO D, EDISON, MONTOYA P, GUILLERMO AND BASTIDA, JAUME. Phytochemical Characterization Of A Biflavonoid Fraction From *Garcinia Madruno*: Inhibition Of Human Ldl Oxidation And Its Free Radical Scavenging Mechanism. *Vitae*, Sept./Dec. 2009, Vol.16, No.3, P.369-377.

PALADINO S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (*Vitis vinífera* L.) Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, 2007, 76 p.

RACHE L, PACHECO J. Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (*Ericaceae*). *Acta Botanica Brasilica* 2010; 24(4): 1086-1095.

RAMIREZ M, GERACITANO L, MARTI BARROS D, HENRIQUES A. Efectos beneficiosos de extractos de frutas rojas y de sus antocianos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2009; 8 (6), 456 – 468

RANJITA BETARBET, TODD B. SHERER, GILLIAN MACKENZIE, MONICA GARCIA-OSUNA, ALEXANDER V. PANOV¹ & J. TIMOTHY GREENAMYRE. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine. Journal of Ethnopharmacology 2004, 91, 65–68.

RENGASAMY RR, RAJASEKARAN A, PERUMAL A. In vitro antioxidant activities of ethanol extract from *Enhalus acoroides* (L.F.) Royle. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2010; 898-901.

RODRIGUEZ J, MENÉNDEZ R, TRUJILLO J. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo 2000.

ROOMI M W, IVANOV V, KALINOVSKY T, NIEDZWIECKI A, RATH M. In Vivo and In Vitro Antitumor Effect of Ascorbic Acid, Lysine, Proline, Arginine, and Green Tea Extracton Human Fibrosarcoma Cells HT-1080. Medical Oncology 2006;23

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.

TROPICOS DATABASE, Distribution (Country occurrence map). <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=40024699&tab=maps> Consultado el 5 de Noviembre de 2011

TSIMIDOU M, LITRIDOU M, BOSKOU D, PAPPALOUISI A, KOTSIFAKI F, PETRAKIS. Grasas Aceites 1998 47:151-157

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.

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

VENEREO J. Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. Rev Cubana Med Milit 2002; 31(2):126-33

VILLEGAS BE. 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.

ANEXOS

Anexo 1. Dosis-Respuesta Porcentaje de viabilidad.

Se presentan los datos de Dosis-Respuesta de la línea celular HT 1080. La proliferación de las células se expresó en porcentaje de viabilidad, la cual se halló mediante la ecuación $\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia Células tratadas} * 100) / \text{Absorbancia Células sin tratar}$. Las células sin tratar equivalen al control.

% Viabilidad					
<i>Bactris minor</i>					
	1	2	3	4	Promedio±SD
Control	100	100	100	100	100
10	90,09	116,56	112,12	100,61	104,84±11,91
50	92,42	110,06	122,56	86,63	102,92±16,46
100	80,47	90,58	105,05	104,86	95,24±11,96
<i>Vitis labrusca</i>					
	1	2	3	4	
Control	100	100	100	100	100
10	119,55	102,32	134,05	106,28	115,55±14,37
50	83,71	102,06	108,92	117,54	103,06±14,37
100	101,00	88,92	106,76	119,11	103,95±12,55
<i>Averrhoa carambola</i>					
	1	2	3	4	
Control	100	100	100	100	100
10	99,42	87,39	100,28	96,57	95,92±5,90
50	100,29	83,28	83,00	91,14	89,43±8,16
100	101,45	108,50	90,08	72,00	93,01±15,93
<i>Vaccinium meridionale</i>					
	1	2	3	4	
Control	100	100	100	100	100
10	117,73	106,25	96,31	128,48	112,19±13,95
50	107,36	96,43	104,19	100,00	101,99±4,78
100	116,72	101,49	102,22	95,67	104,02±8,96

Anexo 2. Porcentaje de viabilidad línea celular HT 1080 dosificados con los extractos y Rotenona 1µM.

La proliferación de las células HT 1080 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.

% Viabilidad					
	1	2	3	4	Promedio±SD
Control Sin Rot	100	100	100	100	0
Control con Rot	20,31	21,59	23,00	25,08	22,49±2,04
<i>Bactris minor</i>					
	1	2	3	4	
10	32,67	35,08	36,50	39,04	35,82±2,66
50	34,96	37,93	38,72	41,29	38,23±2,61
100	34,66	49,03	50,89	59,91	48,62±10,45
<i>Vitis labrusca</i>					
	1	2	3	4	
10	30,53	31,63	32,64	33,63	32,11±1,33
50	36,64	37,33	38,87	41,14	38,50±1,99
100	49,62	49,63	54,15	54,80	52,05±2,82
<i>Averrhoa carambola</i>					
	1	2	3	4	
10	30,84	30,43	31,16	33,18	31,40±1,22
50	31,91	38,38	39,32	43,24	38,21±4,70
100	31,30	31,18	32,49	33,78	32,19±1,22
<i>Vaccinium meridionale</i>					
	1	2	3	4	
10	29,92	30,43	30,27	36,19	31,70±3
50	34,05	35,68	36,05	37,09	35,72±1,26
100	40,46	39,88	42,28	43,39	41,50±1,62

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

3.a. Dosis-Respuesta Extractos

***P<0,001 ; **P<0,01 ; *P<0,05 ; ns P>0,05

Bactris minor

One-way analysis of variance

P value	0,4693
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	4
F	0,9007
R square	0,1838

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,002	3	0,0006667
Residual (within columns)	0,008884	12	0,0007403
Total	0,01088	15	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	P <	Summary	95% CI of diff
Control vs Corozo 10	-0,01475	1,084	No	ns		-0,07187 to 0,04237
Control vs Corozo 50	-0,008	1	No	ns		-0,06512 to 0,04912
Control vs Corozo 100	0,01525	1,121	No	ns		-0,04187 to 0,07237
Corozo 10 vs Corozo 50	0,00675	2	No	ns		-0,05037 to 0,06387
Corozo 10 vs Corozo 100	0,03	2,205	No	ns		-0,02712 to 0,08712
Corozo 50 vs Corozo 100	0,02325	1,709	No	ns		-0,03387 to 0,08037

Vitis labrusca

One-way analysis of variance

P value	0,2444
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	4
F	1,585
R square	0,2839

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,008192	3	0,002731
Residual (within columns)	0,02067	12	0,001722
Total	0,02886	15	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	P <	Summary	95% CI of diff
Control vs Uva 10	-0,05925	2,855	No	ns		-0,1464 to 0,02788

Control vs Uva 50	-0,01075	0,518 1	No	ns	-0,09788 0,07638	to
Control vs Uva 100	-0,01475	0,710 8	No	ns	-0,1019 0,07238	to
Uva 10 vs Uva 50	0,0485	2,337	No	ns	-0,03863 0,1356	to
Uva 10 vs Uva 100	0,0445	2,144 0,192	No	ns	-0,04263 0,1316	to
Uva 50 vs Uva 100	-0,004	8	No	ns	-0,09113 0,08313	to

Averrhoa carambola

One-way analysis of variance

P value	0,4426
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	4
F	0,9612
R square	0,1937

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,002936	3	0,0009787
Residual (within columns)	0,01222	12	0,001018
Total	0,01516	15	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff	
Control vs Carambolo 10	0,014	0,877 4	No	ns	-0,05300 0,08100	to
Control vs Carambolo 50	0,03675	2,303	No	ns	-0,03025 0,1037	to
Control vs Carambolo 100	0,02475	1,551	No	ns	-0,04225 0,09175	to
Carambolo 10 vs Carambolo 50	0,02275	1,426 0,673	No	ns	-0,04425 0,08975	to
Carambolo 10 vs Carambolo 100	0,01075	0,752 8	No	ns	-0,05625 0,07775	to
Carambolo 50 vs Carambolo 100	-0,012	1	No	ns	-0,07900 0,05500	to

Vaccinium meridionale

One-way analysis of variance

P value	0,6395
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	4
F	0,5797
R square	0,1266

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,003259	3	0,001086
Residual (within columns)	0,02248	12	0,001874
Total	0,02574	15	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	P < Summary	95% CI of diff
Control vs Agraz 10	-0,03775	1,744	No	ns	-0,1286 to 0,05313
Control vs Agraz 50	-0,00675	0,311	No	ns	-0,09763 to 0,08413
Control vs Agraz 100	-0,0125	0,577	No	ns	-0,1034 to 0,07838
Agraz 10 vs Agraz 50	0,031	1,432	No	ns	-0,05988 to 0,1219
Agraz 10 vs Agraz 100	0,02525	0,265	No	ns	-0,06563 to 0,1161
Agraz 50 vs Agraz 100	-0,00575	0,265	No	ns	-0,09663 to 0,08513

3.b Rotenona+Extractos

***P<0,001 ; **P<0,01 ; *P<0,05 ; ns P>0,05

Bactris minor

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	121,1
R square	0,97

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,577	4	0,1443
Residual (within columns)	0,01787	15	0,001191

Total 0,5949 19

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? 0,05?	P <	Summary	95% CI of diff
No Rot vs Con Rot	0,4688	27,16	Yes	***		0,3934 to 0,5441
No Rot vs Corozo 10+Rot	0,427	24,74	Yes	***		0,3516 to 0,5024
No Rot vs Corozo 50+Rot	0,411	23,82	Yes	***		0,3356 to 0,4864
No Rot vs Corozo 100+Rot	0,3415	19,79	Yes	***		0,2661 to 0,4169
Con Rot vs Corozo 10+Rot	-0,04175	2,419	No	ns		-0,1171 to 0,03361
Con Rot vs Corozo 50+Rot	-0,05775	3,347	No	ns		-0,1331 to 0,01761
Con Rot vs Corozo 100+Rot	-0,1273	7,374	Yes	***		-0,2026 to 0,05189
Corozo 10+Rot vs Corozo 50+Rot	-0,016	0,927	No	ns		0,05936 to -0,1609
Corozo 10+Rot vs Corozo 100+Rot	-0,0855	4,955	Yes	*		0,01014 to -0,1449
Corozo 50+Rot vs Corozo 100+Rot	-0,0695	4,027	No	ns		0,005860 to -

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	5
F	861
R square	0,9957

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,5975	4	0,1494
Residual (within columns)	0,002602	15	0,0001735
Total	0,6001	19	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? 0,05?	P <	Summary	95% CI of diff
No Rot vs Con Rot	0,4688	71,1	Yes	***		0,4400 to 0,4975
No Rot vs Rot 10 Uva	0,4518	68,6	Yes	***		0,4230 to 0,4805
No Rot vs Rot 50 Uva	0,4093	62,1	Yes	***		0,3805 to 0,4380
No Rot vs Rot 100 Uva	0,319	48,4	Yes	***		0,2902 to 0,3478

Con Rot vs Rot 10 Uva	-0,017	2,58 1	No	ns	-0,04576 0,01176	to
Con Rot vs Rot 50 Uva	-0,0595	9,03 5	Yes	***	-0,08826 0,03074	to -
Con Rot vs Rot 100 Uva	-0,1498	22,7 4	Yes	***	-0,1785 0,1210	to -
Rot 10 Uva vs Rot 50 Uva	-0,0425	6,45 3	Yes	**	-0,07126 0,01374	to -
Rot 10 Uva vs Rot 100 Uva	-0,1328	20,1 6	Yes	***	-0,1615 0,1040	to -
Rot 50 Uva vs Rot 100 Uva	-0,09025	13,7	Yes	***	-0,1190 0,06149	to -

Averrhoa carambola

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	605
R square	0,9938

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,6465	4	0,1616
Residual (within columns)	0,004008	15	0,0002672
Total	0,6505	19	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
No Rot vs Con Rot	0,4688	57,36	Yes	***	0,4331 to 0,5044
No Rot vs Carambolo 10+Rot	0,4565	55,86	Yes	***	0,4208 to 0,4922
No Rot vs Carambolo 50+Rot	0,411	50,29	Yes	***	0,3753 to 0,4467
No Rot vs Carambolo 100+Rot	0,4513	55,21	Yes	***	0,4156 to 0,4869
Con Rot vs Carambolo 10+Rot	-0,01225	1,499	No	ns	-0,04794 to 0,02344
Con Rot vs Carambolo 50+Rot	-0,05775	7,066	Yes	**	-0,09344 to 0,02206
Con Rot vs Carambolo 100+Rot	-0,0175	2,141	No	ns	-0,05319 to 0,01819
Carambolo 10+Rot vs Carambolo 50+Rot	-0,0455	5,567	Yes	**	-0,08119 to 0,009810
Carambolo 10+Rot vs Carambolo 100+Rot	-0,00525	0,642 4	No	ns	-0,04094 to 0,03044
Carambolo 50+Rot vs Carambolo 100+Rot	0,04025	4,925	Yes	*	0,004560 to 0,07594

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	1034
R square	0,9964

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,6204	4	0,1551
Residual (within columns)	0,002249	15	0,00015
Total	0,6226	19	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
No Rot vs Con Rot	0,4688	76,5 6	Yes	***	0,4420 to 0,4955
No Rot vs Agraz 10+Rot	0,4545	74,2 3	Yes	***	0,4278 to 0,4812
No Rot vs Agraz 50+Rot	0,4278	69,8 6	Yes	***	0,4010 to 0,4545
No Rot vs Agraz 100+Rot	0,3893	63,5 7	Yes	***	0,3625 to 0,4160
Con Rot vs Agraz 10+Rot	-0,01425	2,32 7	No	ns	-0,04099 to 0,01249
Con Rot vs Agraz 50+Rot	-0,041	6,69 6	Yes	**	-0,06774 to -0,01426
Con Rot vs Agraz 100+Rot	-0,0795	12,9 8	Yes	***	-0,1062 to -0,05276
Agraz 10+Rot vs Agraz 50+Rot	-0,02675	4,36 9	Yes	*	-0,05349 to -1,214e-005
Agraz 10+Rot vs Agraz 100+Rot	-0,06525	10,6 6	Yes	***	-0,09199 to -0,03851
Agraz 50+Rot vs Agraz 100+Rot	-0,0385	6,28 8	Yes	**	-0,06524 to -0,01176

