

# **Influencia de la variedad geográfica en las funciones inmunomoduladoras del cacao**

Nombre y apellidos del autor: Mariano Nicola Llorente

Nombre del tutor: Francisco José Pérez Cano

*Nutrients* **2019**

1 *Artículo*

## 2 **Influencia de la variedad geográfica en las funciones**

### 3 **inmunomoduladoras del cacao**

4 **Resumen:** Estudios previos han mostrado los efectos del cacao o de sus componentes bioactivos  
5 aislados sobre la función inmunitaria y sobre la salud. En el presente artículo, se muestra la  
6 heterogeneidad en cuanto a polifenoles totales y el efecto inmunomodulador según el origen del  
7 cacao sobre leucocitos esplénicos, analizando la secreción de citocinas TNF $\alpha$  e IL-10. Los esplenocitos  
8 fueron extraídos del bazo de ratas Brown Norway mediante la disgregación de este y purificación de  
9 la suspensión celular. Dichas células fueron cultivadas y tratadas con 10  $\mu$ g/mL de las diferentes  
10 variedades de cacao, lo cual no afectó a la proliferación celular, durante 2 horas y, posteriormente,  
11 estimuladas con 100 ng/mL de LPS durante toda la noche. Se observó que dos variedades de cacao  
12 (codificación: P07 y P09) conseguían una disminución de la secreción de IL-10, y otras dos variedades  
13 (codificación: P01 y P09) presentaban diferencias significativas entre ellas en la secreción de TNF $\alpha$ .  
14 Estos resultados revelan el efecto inmunomodulador diferencial según el origen del cacao.

15 **Palabras clave:** Esplenocito ; Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) ; Interleucina 10 (IL-10) ;  
16 Lipopolisacárido bacteriano (LPS) ; Flavonoides .  
17

18 **Abstract:** Previous studies have shown the effects of cocoa or its isolated bioactive components on  
19 immune function and health. This article shows the heterogeneity in terms of total polyphenols and  
20 the immunomodulatory effect according to the origin of cocoa on splenic leukocytes, analyzing the  
21 secretion of TNF $\alpha$  and IL-10 cytokines. Splenocytes were extracted from the spleen of Brown Norway  
22 rats by disintegrating it and purifying the cell suspension. These cells were cultured and treated with  
23 10  $\mu$ g / mL of the different cocoa varieties, which did not affect cell proliferation, for 2 hours and  
24 subsequently stimulated with 100 ng / mL of LPS overnight. It was observed that two cocoa varieties  
25 (coding: P07 and P09) achieved a decrease in the secretion of IL-10, and two other varieties (coding:  
26 P01 and P09) had significant differences between them in the secretion of TNF $\alpha$ . These results reveal  
27 the differential immunomodulatory effect depending on the origin of cocoa.  
28

29 **Keywords:** Splenocito ; Tumor necrosis factor alpha (TNF) ; Interleukin 10 (IL-10) ; Bacterial  
30 lipopolysaccharide (LPS) ; Flavonoids.  
31  
32  
33  
34

35

36

## 37 1. Introducción

38 La inflamación es un mecanismo fisiológico resultado de la activación del sistema inmunitario  
39 por la interacción de patógenos u otros agentes (parásitos, bacterias, traumatismo, toxinas, etc.) con  
40 el huésped que pueden desencadenar daño tisular. Este proceso aparece también en diferentes  
41 enfermedades como el cáncer, Alzheimer, diabetes y alergias [1,2]. Los factores implicados en iniciar  
42 y mantener la inflamación son las células del sistema inmunitario innato (neutrófilos y  
43 monocitos/macrófagos), adaptativo (diferentes tipos de linfocitos), así como los mediadores  
44 inflamatorios que estas producen [2]. El proceso inflamatorio dependerá del balance final entre las  
45 diferentes citocinas secretadas. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) que es una  
46 citocina proinflamatoria es producida por macrófagos, células *natural killer* y linfocitos T helper [3,4];  
47 mientras que la interleucina 10 (IL-10) es antiinflamatoria y es producida por linfocitos T, B y  
48 macrófagos [5,6]

50 Se han realizado estudios a nivel *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación y en humanos  
51 del efecto del cacao o de sus componentes bioactivos aislados, observándose resultados  
52 antiinflamatorios, antidiabéticos, inmunomoduladores, entre otros [7]. Este trabajo se centrará en las  
53 acciones inmunomodularas del cacao.

54 A nivel *in vitro*, diferentes estudios han observado efectos antiinflamatorios ya que tiene un  
55 impacto sobre la secreción de mediadores inflamatorios en macrófagos y leucocitos [7]. Se ha visto  
56 mediante un estudio realizado en línea celular de monocitos/macrófagos, que el extracto de  
57 polifenoles de semillas de cacao tostados favorece por una parte, el estado fenotípico de estos  
58 macrófagos a un estado antiinflamatorio M2 y por otra, inhibe la inflamación mediada por el fenotipo  
59 M1 que es proinflamatorio [8]. También se ha estudiado que extractos de cacao ricos en flavonoides  
60 producen una disminución en la secreción de  $TNF\alpha$ , proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)  
61 y de óxido nítrico (NO) en macrófagos estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) [7]. En  
62 cuanto a linfocitos estimulados con acetato de forbol-miristato se observó que reducía la producción

63 de IL-2, citocina que promueve la proliferación linfocítica considerándose que este efecto inhibitorio  
64 se producía a nivel transcripcional [9,10].

65 A nivel preclínico, se ha observado en diferentes estudios que el cacao tiene propiedades  
66 inmunomoduladoras [11,12]. Un estudio realizado en un modelo de ratas Brown Norway a las que  
67 se le indujo una alergia alimentaria con ovoalbúmina (OVA), el cacao indujo una disminución de  
68 inmunoglobulinas (Ig) E anti-ova, otros anticuerpos relacionados con la respuesta de los linfocitos T  
69 helper 2 (Th2)(IgG1 e IgG2a) [11,12] y una leve inhibición de la liberación de la proteasa II de los  
70 mastocitos [12]. Otros estudios sobre los efectos inmunomoduladores del cacao muestran que una  
71 dieta enriquecida con este alimento moduló la producción de citocinas y anticuerpos específicos anti-  
72 colágeno en ratas hembras Louvain con artritis inducida, disminuyéndolos, y en ratas Wistar con  
73 colitis inducida con sulfato de dextrano sódico, se observó un efecto similar en la producción de  
74 citocinas y, además, mejoró la capacidad antioxidante incrementando el contenido en glutatión en el  
75 colon, disminuyó la producción de TNF $\alpha$ , la actividad óxido nítrico sintasa (NOs) y la infiltración  
76 celular en el colon [13].

77 Existen pocos estudios del efecto del cacao o de sus componentes bioactivos en el ser humano y  
78 menos en el contexto de la inflamación, por lo que es necesario realizar más estudios para entender  
79 el efecto potencialmente beneficioso para la salud de este alimento. Así, un estudio epidemiológico  
80 realizado en estudiantes universitarios sugiere que un consumo de cacao podría tener una relación  
81 inversa con enfermedades crónicas y la presencia de síntomas alérgicos [14]. Por otra parte,  
82 investigaciones emergentes proponen que los flavonoides tienen un impacto positivo en  
83 enfermedades cardiovasculares (ECV) y neurológicas [15], no obstante, no se conocen con precisión  
84 los mecanismos específicos ni la dosis de ingesta de flavonoides para que hagan tal efecto.

85 Sin embargo, existe mucha variabilidad en estos estudios ya que el seguimiento de las dietas no  
86 está bien controlado por lo que son poco fiables, además de que el alimento presenta variabilidad en  
87 su composición debido a su procesado (fermentación, secado, tostado) o simplemente a su variedad

88 genética [16–18]. Un estudio analizó el contenido de procianidinas del licor de cacao procedente de 8  
89 orígenes geográficos (Nueva Guinea, Ghana, Costa de Marfil, Venezuela, Ecuador, Trinidad, Java y  
90 Madagascar) y observaron que el contenido de procianidinas variaba según el origen, siendo el de  
91 Madagascar el que presentaba mayor cantidad [18].

92 Es evidente la necesidad de realizar estudios con variedades específicas del alimento como, por  
93 ejemplo, con alguna variedad concreta de cacao, para poder así eliminar o reducir el efecto variedad  
94 en la composición. Llegados a ese punto y solucionando el problema del seguimiento de las dietas,  
95 se podría realizar estudios observacionales en humanos de forma más eficiente para probar la  
96 causalidad del efecto.

97 Un estudio previo realizado en el grupo de “Autoinmunidad y Tolerancia” de la Facultad de  
98 Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona sugiere, por una parte, que  
99 aunque ciertas variedades de cacao presentan cierta homogeneidad en cuanto a su contenido total de  
100 polifenoles, algunas variedades, consiguen un efecto significativo más claro en la reducción de la  
101 producción de TNF $\alpha$  sobre macrófagos peritoneales estimulados con LPS [19].

102 El cacao o sus extractos tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios, pero hay una necesidad  
103 de normalizar los estudios ya que el contenido de sus compuestos bioactivos es diferente según el  
104 origen, por lo que el objetivo de este estudio es analizar el contenido fenólico de 5 variedades  
105 geográficamente distintas de cacao peruano, además de estudiar el efecto diferencial de estas  
106 variedades referente a su capacidad antiinflamatoria.

107

108

109

110

## 111 2. Materiales y Métodos

### 112 2.1. Diseño experimental

113 A continuación, se resume el diseño experimental (**Figura 1**). Brevemente, se dispuso de  
 114 extractos de cacao previamente triturados, diluidos y filtrados para ver el efecto modulador sobre la  
 115 producción de citocinas. Para ello se partió de ratas Brown Norway hembras a las que se les realizó  
 116 una laparotomía abdominal para extraer el bazo, para la obtención de esplenocitos y con la ayuda de  
 117 un contador celular automatizado Countess™ se sembraron  $1 \times 10^6$  células/mL por pozo sobre una  
 118 placa de cultivo celular. Las células se cultivaron con diversos extractos de cacao correspondientes a  
 119 distintas variedades de cacao peruano y tras la estimulación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) se  
 120 estudió el efecto modulador sobre la producción de citocinas mediante el método de *ELISA* de tipo  
 121 *SANDWICH* y su efecto sobre la viabilidad celular mediante el contador celular Countess™.



122 **Figura 1.** Diseño experimental utilizado (LPS, lipopolisacárido; TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; IL-  
 123 10, interleucina 10; SN, sobrenadante)

124

### 125 2.2. Variedades de cacao ensayadas

126 Se dispuso de 4 muestras de pasta de cacao, donde cada una de ellas correspondía a una  
 127 variedad regional peruana: Blanco de Piura (Costa Norte, BP), Criollo de Montaña (Selva Centro,  
 128 CM), Chungo del Cusco (Selva Sur, CC) y Amazonas Perú (Selva Norte, AP). Además, también se  
 129 utilizó un cacao sin denominación específica como referencia (REF). Para la aplicación de las muestras  
 130 en los ensayos se prepararon extractos. Una muestra de la pasta de cacao de cada muestra se

131 pulverizó con ayuda de Thermomix. Posteriormente se realizó una dilución 1/50 (solución madre) en  
132 agua caliente y después se hicieron diluciones 1/8 en dimetilsulfóxido (DMSO) a partir de la solución  
133 madre. Se vertieron las soluciones en tubos para centrifugarlos a 1881 g, 10 min. La fase intermedia  
134 se recolectó y se filtró en campana, como en estudios previos [19]. El filtrado se recogió y se  
135 alicuotaron en tubos que se almacenaron a -20 °C protegidos de la luz.

### 136 2.3. Determinación de polifenoles

137 Se prepararon los siguientes reactivos: Folin-Ciocalteu (F-C) (Sigma-Aldrich) 1N en H<sub>2</sub>O  
138 destilada; ácido gálico (AG) a 0,1 mg/mL; y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% en H<sub>2</sub>O destilada. A continuación, se  
139 preparó una curva estándar de ácido gálico (1-16 µg/mL) y las muestras a una dilución 1/10, junto  
140 con los reactivos anteriores. El reactivo de F-C se diluyó en el estándar y en la muestra a razón de 1/8,  
141 mientras que el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 5/8 alcanzando un volumen final de 2 mL.

142 Al finalizar la mezcla de componentes, se dejó incubar protegido de la luz durante 2 h. Después,  
143 se leyó en el espectrofotómetro (Shimadzu, UV-visible recording spectrophotometer) a 765 nm.

### 144 2.4. Animales

145 Se dispuso de ratas Brown Norway (Janvier), siguiendo las directrices institucionales para el uso  
146 de animales de experimentación, establecidas por el Comité Ético de Experimentación Animal  
147 (CEEA) de la Universidad de Barcelona y para la Generalidad de Cataluña, según el procedimiento  
148 autorizado (DAAM 8582)

### 149 2.5. Obtención de esplenocitos

150 Se anestesió al animal con una inyección intramuscular de Ketamina/Xilacina. La dosis de  
151 Ketmanina fue de 90 mg/Kg (Merial Laboratorios, S.A, Barcelona, Spain) y la de Xilacina de 10 mg/Kg  
152 (Bayer, A.G, Leverkusen, Germany). Se prosiguió a la incisión en la zona peritoneal, previamente  
153 desinfectada con ETOH 70%, con material quirúrgico estéril. Con la ayuda de pinzas y tijeras se abrió

154 la zona peritoneal hasta cortar el diafragma, hecho que supone la parada respiratoria del animal.  
155 Entonces, se prosiguió con la extracción del bazo, localizado en la zona dorsal izquierda. Una vez  
156 extraído el bazo se sumergió rápidamente en 5 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)  
157 (Thermo Fisher Scientific) al 1% FBS, 1% de glutamina, 1% de penicilina/streptomycin y 0,05% de 2-  
158 mercaptoetanol (en un tubo Falcon estéril y en hielo).

159 En una cabina de flujo laminar se decantó el bazo sobre una malla estéril de 40  $\mu\text{m}$  (Falcon®, A  
160 Corning Brand) descartando el medio. A continuación, se colocó la malla en una placa de Petri sobre  
161 hielo. Se vertió, con la ayuda de una pipeta Pasteur, medio RPMI-1% sobre la malla y se prosiguió a  
162 la trituración del bazo con un émbolo de una jeringa de 2,5 mL. Se fue añadiendo medio y  
163 disgregando varias veces. El filtrado que estaba en la placa de Petri se recogió con una pipeta Pasteur  
164 en un tubo estéril hasta alcanzar 10 mL. A continuación, se centrifugó a 538 g (Megafuge 2.0R;  
165 HERAUS) a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante (SN) se descartó y el sedimento celular se preparó  
166 para la lisis de eritrocitos. Se resuspendió el sedimento en 1 mL de medio RPMI-1%, luego se pipeteó  
167 8 mL de agua destilada estéril para obtener así un medio hipotónico, se agitó por inversión tres veces  
168 e inmediatamente se adicionó 1 mL de PBS 10X y se agitó por inversión para reestablecer el medio de  
169 hipotónico a isotónico. El tubo se centrifugó a 538 g (Megafuge 2.0R; HERAUS) a 4 °C durante 10 min.  
170 Se eliminó el SN por decantación y se resuspendió en 10 mL de medio RPMI-1%, primero  
171 resuspendiendo con 1 mL y luego con los 9 mL restantes, siempre mantenido en frío.

## 172 2.6. Recuento y cultivo de esplenocitos

173 Para el cultivo de esplenocitos se partió del tubo con esplenocitos aislados obtenido en el  
174 apartado anterior. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células/mL en cada uno de los 12 pozos de una placa de cultivo  
175 celular. Para conseguir dicha suspensión se realizó el recuento de células con el Countess™  
176 (Countess™ Automated Cell Counter).



178 Se realizó una dilución 1/10 recogiendo 5  $\mu\text{L}$  de la muestra en 45  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1% y a  
179 partir de dicha dilución se recogieron 10  $\mu\text{L}$  y se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de tripan Blue (Invitrogen by  
180 Thermo Fisher Scientific), a continuación, se mezcló con la ayuda de una pipeta. Se cargaron 10  $\mu\text{L}$   
181 de la suspensión en una cámara Countess™ (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) y se hizo el recuento.  
182 En función del recuento obtenido se procedió a preparar el volumen necesario para conseguir una  
183 suspensión cuya concentración fuera de  $1 \times 10^6$  células/mL.

184 Se sembraron  $1 \times 10^6$  células/mL de la suspensión celular en cada uno de los 12 pozos de la placa  
185 de cultivo celular, a continuación, se añadieron los diferentes extractos de cacao en los pozos,  
186 dejando controles que solo presentaba la suspensión celular y 50  $\mu\text{L}$  de DMSO ya que es el medio  
187 donde se solubilizaron las muestras de cacao. A las 2 h se añadió el estímulo de LPS (Sigma-Aldrich)  
188 a una dosis de 100 ng/mL a los pozos que presentaban cacao y a algunos controles. Finalmente se  
189 incubó a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  toda la noche.

190 Por último, se recolectaron las suspensiones celulares de los pozos y se centrifugaron (Megafuge  
191 2.0R; HERAUS) a 538 g a 4 °C durante 10 min y después se recogieron los SN para el posterior análisis  
192 de citocinas (TNF $\alpha$  e IL-10). El sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1% para  
193 el recuento y el estudio de la viabilidad celular.

#### 194 2.7. Cuantificación de TNF $\alpha$ e IL-10 de los esplenocitos cultivados

195 Para la determinación de la concentración de TNF $\alpha$  e IL-10 de los esplenocitos se realizó una  
196 técnica de ELISA de tipo SANDWICH siguiendo los pasos especificados en el Kit de análisis  
197 cuantitativo de TNF $\alpha$  (BD OptEIA™, Rat TNF ELISA Set) y de IL-10 (BD OptEIA™, Rat IL-10 ELISA  
198 Set).

199 Para la sensibilización de la placa: se preparó una dilución 1/250 del anticuerpo de captura anti-  
200 rata TNF $\alpha$  (51-9004719, BD OptEIA™, BD Bioscience) o IL-10 en solución de captura y se sembró en  
201 placas Nunc Maxisorp 100  $\mu\text{L}$ /pozo, excepto en el A1 que constituyó el blanco. Se incubó toda la

202 noche a 4 °C en cámara húmeda. Posteriormente se vació la placa y se realizaron 5 lavados con 200  
203 µL/pozo de la solución de lavado (PBS 7.0 + Tween 0,05%). Se vació la placa y se sembró la solución  
204 de bloqueo (PBS 7.0 + FBS 10%), excepto al blanco. Entonces, se incubó 1 h a temperatura ambiente  
205 en cámara húmeda. Después se repitió el proceso de lavado.

206 Se prepararon los estándares entre 2000 y 31.25 pg/mL haciendo diluciones seriadas en solución  
207 de bloqueo (PBS 7.0 + FBS 10) la muestra se preparó a una dilución 1/5 para la cuantificación de TNFα  
208 y sin diluir para IL-10. Además, se sembraron los controles con la solución diluyente. Luego se incubó  
209 durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al finalizar la incubación se dispuso a  
210 realizar el proceso de lavado.

211 Para la reacción con el anticuerpo de detección y el inmunoconjugado enzimático, se preparó  
212 una dilución 1/250 del anticuerpo de detección anti-rata TNFα biotinizado (51-9004720, BD OptEIA™,  
213 BD Bioscience) o del anticuerpo de detección anti-rata IL-10 biotinizado y se dejó incubar toda la  
214 noche a 4 °C en cámara húmeda. A posteriori se realizó el proceso de lavado. En el caso de la IL-10,  
215 la reacción con el anticuerpo inmunoconjugado enzimático, se llevó a cabo mediante la adición de  
216 una dilución 1/500 de la estreptavidina-HRP (51-9004787, BD OptEIA™, BD Bioscience) en solución  
217 diluyente. Luego se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y se prosiguió  
218 al lavado.

219 Para el revelado enzimático, se preparó una solución extemporánea de diclorhidrato de o-  
220 fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich) (0,4 mg/mL) para el TNFα y de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina  
221 (TMB, Sigma-Aldrich) en solución amortiguadora de citrato fosfato pH 5. Justo antes de que se haya  
222 sembrado el sustrato, se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% de manera que la concentración en la solución fuese  
223 0,04%. Se sembró el OPD y se dejó unos 30 min en agitación. La reacción se detuvo con 50 µL/pozo  
224 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M para el TNFα y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M para la IL-10. Por último, se leyó la absorbancia en un  
225 espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm con lecturas intermedias a 450 nm para el  
226 TNFα y a 450 nm con lecturas intermedias a 650nm para la IL-10.

## 227 2.8 Evaluación de la viabilidad post-cultivo

228 El recuento y la viabilidad celular se realizó con el contador celular Countess™ a partir del  
229 sedimento celular post-cultivo obtenido en el punto 2.6. *Recuento y cultivo de esplenocitos*. El  
230 procedimiento es el mismo que está explicado en el mencionado punto.

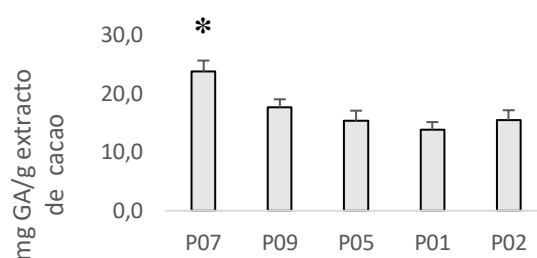
## 231 2.9. Estadística

232 Los resultados referentes a la cuantificación de polifenoles totales, cuantificación de TNF $\alpha$ , IL-  
233 10 y de la evaluación de la viabilidad post-cultivo fueron analizados mediante el *software* SPSS (IBM  
234 SPSS Statistics 22.0) realizándose pruebas ANOVA, una vez confirmada la homogeneidad de  
235 varianza y la distribución normal de las muestras, y pruebas de rango post hoc que determinaron  
236 qué medias difieren.

## 237 3. Resultados

### 238 3.1. Polifenoles totales de las muestras de cacao

239 Se dispusieron de 4 muestras de pasta de cacao correspondientes a 4 variedades de cacao nativo  
240 de Perú y una muestra de referencia denominadas cada una de ellas con la siguiente codificación:  
241 P01, P02, P05, P07 y P09. La procedencia de los cacaos se mantuvo de forma anónima para los  
242 investigadores y la nomenclatura se estableció en origen. En primer lugar, se determinaron los  
243 polifenoles totales de todas las muestras, cuyos resultados se observan en la **Figura 3**. Los polifenoles  
244 totales se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu por lo que los resultados fueron expresados  
245 en mg de ácido gálico / g de extracto de cacao.

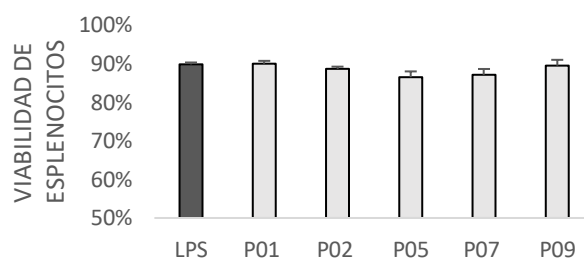


247 **Figura 3.** Polifenoles totales presentes en las diferentes muestras de cacao. Estadística: \*p<0,05  
248 P07 vs P01, P02, P05.

249 Los resultados mostraron que la cantidad de polifenoles totales, tras la extracción realizada,  
250 fueron similares entre variedades geográficas distintas, siendo del orden de 15 - 23 mg AG / g de  
251 producto. Solamente se hallaron diferencias significativas entre las cantidades de polifenoles totales  
252 del cacao P07 y los cacaos P01, P02 y P05 (p<0,05).

### 253 3.2. Efecto sobre la viabilidad de los cacaos ensayados

254 En la **Figura 4** se visualiza el efecto sobre la viabilidad de los esplenocitos al ser cultivados a seis  
255 condiciones, las cuales son las mismas que las mencionadas anteriormente.



256

257 **Figura 4.** Efecto de los cacaos P01, P02, P05, P07 y P09 sobre la viabilidad celular post-cultivo. El  
258 medio de las placas se centrifugó y el sedimento celular se resuspendió con medio RPMI-1%, entonces  
259 se pipeteó un inóculo junto con el colorante en la cámara del contador celular Countess™ para el  
260 recuento celular.

261 El recuento celular post-cultivo fue del orden de  $1,85 - 2,37 \times 10^6$  células/mL, no habiendo  
262 diferencias significativas de las diferentes condiciones sobre la viabilidad celular. Hecho que permitió  
263 establecer el tiempo de incubación como adecuado para el diseño experimental.

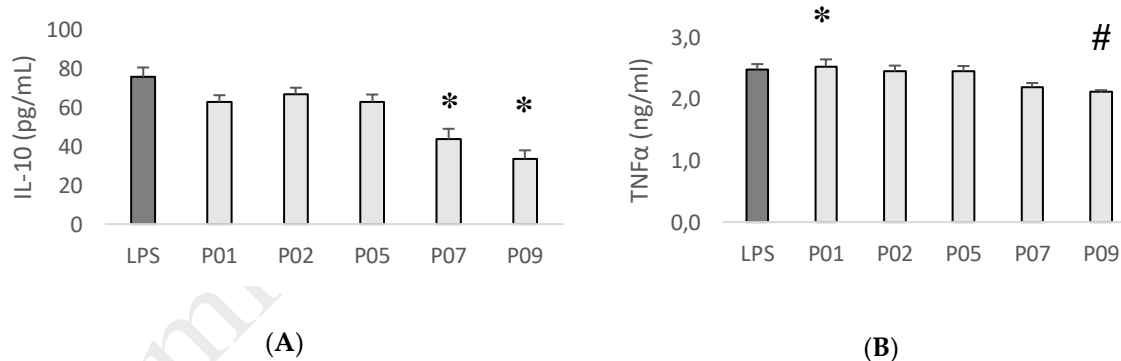
### 264 3.3. Efecto modulador de la producción de IL-10 de los cacaos ensayados

265 En la **Figura 5A** se observa la producción de IL-10 a las seis condiciones en las que se cultivaron  
266 los esplenocitos. Las condiciones presentaban la misma concentración de DMSO utilizado en la  
267 solubilización de los extractos de cacao y LPS, la diferencia radicaba en que en las cinco últimas existió  
268 un pretratamiento de los esplenocitos con los cacaos P01, P02, P05, P07 y P09, todos a una  
269 concentración de 10 µg/mL. Esta dosis, es similar a la utilizada en estudios previos [20] y en otros  
270 estudios [19,21]. La concentración del estímulo de LPS fue de 100 ng/mL, también de forma similar a

271 otros estudios realizados sobre macrófagos [22]. Para establecer la capacidad moduladora de los  
 272 extractos de cacao se utilizó como referencia la condición que no presentaba el tratamiento con cacao.  
 273 Tras la estimulación con LPS, los esplenocitos produjeron cantidades de IL-10 del orden de 33 - 75  
 274 pg/mL, valores similares a los obtenidos en otros estudios con linfocitos de ganglios linfáticos  
 275 mesentéricos de ratas estimulados con acetato de forbol-miristato (PMA) junto con Ionomicina (Io) a  
 276 una concentración de 250 ng/mL [23]. Se observaron diferencias significativas entre las condiciones  
 277 de tratamiento de los cacaos P07 y P09 con el resto de cacaos ( $p < 0,05$ ).

### 278 3.4. Efecto modulador de la producción de TNF $\alpha$ de los cacaos ensayados

279 En la **Figura 5B** se observa la producción de TNF $\alpha$  a las seis condiciones en las que se cultivaron  
 280 los esplenocitos. Tras la estimulación, los esplenocitos produjeron cantidades de TNF $\alpha$  del orden de  
 281 2,10 - 2,5 ng/mL. Únicamente se observaron diferencias significativas entre la condición de  
 282 tratamiento del cacao P01 y la condición P09 ( $p < 0,05$ ).



284 **Figura 5.** Resultados de los diferentes ensayos. (A) Efecto de los cacaos P01, P02, P05, P07 y P09  
 285 sobre la producción de IL-10. Los esplenocitos extraídos del bazo fueron cultivados en placas de  
 286 cultivo celular e incubados con cacao durante 2 h para posteriormente ser estimulados con LPS toda  
 287 la noche. Se dejaron pozos de la placa de cultivo como referencia, siendo estos estimulados sin previa  
 288 incubación con cacao (N=6, donde cada condición procede de un animal diferente). Estadística:  
 289 \* $p < 0,05$  P07 y P09 vs el resto; (B) Efecto de los cacaos P01, P02, P05, P07 y P09 sobre la producción de  
 290 TNF $\alpha$ . (N=6). Estadística: \*# $p < 0,05$  P01 vs P09.

291

292

293

#### 294 4. Discusión

295 Este estudio sugiere el importante papel que juegan los antecedentes genéticos referentes a  
296 variedades de plantas de cacao para determinar el potencial antioxidante. Como se observó, las  
297 diferentes variedades geográficas de cacao presentan valores algo heterogéneos en cuanto a su  
298 contenido total en polifenoles, siendo la variedad de cacao P07 la que presenta valores  
299 significativamente más elevados comparado con el resto (exceptuando el cacao P09). Este hecho está  
300 en línea con otros estudio en que analizaron el contenido de procianidinas de cacaos de diferentes  
301 orígenes y también se observaron diferencias significativas (hasta 8 veces) en la concentración total  
302 de procianidinas de diferente peso molecular (moléculas compuestas) entre los diferentes orígenes  
303 continentales [18].

304 El objetivo principal de este trabajo fue determinar la influencia inmunomoduladora de los  
305 cacaos y para ello, primero se tuvo que determinar si la dosis de los extractos de cacao suponía un  
306 efecto de citotoxicidad sobre las células ensayadas. En las condiciones de nuestro estudio no se  
307 encontró un efecto negativo en la proliferación de los esplenocitos con ninguno de los extractos de  
308 cacao analizados a la dosis de 10 µg/mL como en estudios previos que trataban una línea celular de  
309 linfocitos con extractos de cacao a concentraciones que iban entre 5 a 80 µg/mL y tampoco se  
310 observaron efectos significativos sobre la viabilidad [24].

311 \*La IL-10 es una citocina producida principalmente por las células Th2 y presenta gran  
312 capacidad antiinflamatoria porque disminuye la inflamación mediada por macrófagos y linfocitos  
313 Th1 [24]. Esta citocina, adicionalmente a lo mencionado, es efectiva en la reducción de otras citocinas  
314 proinflamatorias: IL-2, IL-6, IL-1β, IL-12, factor de estimulante de colonias de granulocitos y  
315 macrófagos (GM-CSF), TNFα e interferón gamma (IFNγ) [25]. Hay diversidad de resultados en  
316 cuanto al efecto del cacao sobre las células inmunitarias. Nuestro estudio muestra que los extractos  
317 de cacaos P07 y P09 consiguieron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del 42% y 55%,  
318 respectivamente, en la producción de IL-10. Otro estudio realizado con cultivos primarios de

319 linfocitos estimulados con PMA/Io, los cuales provienen de ratas alimentadas con 4% y 10% de cacao,  
320 no dieron lugar a una modificación en la producción de IL-10 en comparación con el grupo control  
321 de ratas no alimentadas con cacao [26]. Cabe señalar que estos efectos no se observa en linfocitos  
322 humanos cultivados y tratados con dosis de extractos de cacao 10 µg/mL u otras concentraciones de  
323 flavanoles y procianidinas aisladas de cacao, ya que mejoran la producción de IL-10 [27,28]. Así, se  
324 puede confirmar que estos cacaos sí presentan capacidad inmunomoduladora, a pesar de que una  
325 disminución en la producción de esta citocina antiinflamatoria no parezca un hecho de interés a nivel  
326 de inflamación, hecho que debe estudiarse en el contexto de secreción de otras citocinas.

327 El TNF $\alpha$  es una citocina proinflamatoria producida por macrófagos, células NK, linfocitos Th,  
328 entre otras células [3,4]. A bajas concentraciones presenta efectos beneficiosos sobre tejidos,  
329 haciéndolos más resistentes frente a infecciones, no obstante a concentraciones altas puede originar  
330 alteraciones tisulares que podrían desembocar en un shock séptico [4]. Las diferentes variedades de  
331 cacao no consiguieron modificar significativamente la producción de TNF $\alpha$  comparados con el  
332 control, no obstante, sí se vieron diferencias significativas entre los cacaos P01 y P09, siendo este  
333 último el que bloqueó la secreción de TNF $\alpha$  en casi un 14% en comparación con el cacao P01. Es de  
334 destacar que a pesar de que ambos no presentan diferencias significativas en cuanto a la cantidad de  
335 polifenoles totales, sea de esperar que el perfil polifenólico de ambos extractos sea diferente. Estudios  
336 previos sobre cultivos primarios de macrófagos peritoneales estimulados con LPS muestran que el  
337 efecto del cacao P02 fue significativo en comparación con el control, ya que inhibió en un 30% la  
338 secreción de TNF $\alpha$  [19], otro estudio sobre una línea celular de macrófagos muestra un bloqueo más  
339 acentuado de hasta un 60% la secreción de TNF $\alpha$  con el uso de un extracto de cacao convencional  
340 [20]. Con ello, se podría sugerir que los componentes bioactivos del cacao (flavonoides) presentan un  
341 efecto diferencial *in vitro* en función del tipo de células a ensayar y el origen del cacao.

342 No se conoce con claridad el mecanismo de acción de los compuestos bioactivos del cacao sobre las  
343 células, pero hay estudios que sugieren que dichos compuestos disminuyen la expresión génica del  
344 TNF $\alpha$ . Se sabe que algunos factores transcripcionales como NF-kB y AP1 son conocidos por ser

345 sensibles al ambiente redox. Los flavonoides, por su capacidad antioxidante, pueden modificar dicho  
346 ambiente de forma que son capaces de inhibir cascadas de señalización modificando la expresión  
347 génica [20]. Otros estudios defienden que esta capacidad antioxidante no está ligada a disminuir  
348 directamente la secreción de sustancias proinflamatorias, ya que la isoquercitrina (flavonol), cuya  
349 actividad antioxidante es menor que la epicatequina (flavanol), produce un descenso mayor en la  
350 secreción de proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y TNF $\alpha$  [29,30]. Se podría concluir  
351 que los cacaos P01 y P09 al ser de variedades geográficas distintas, su perfil fenólico y de otros  
352 componentes no valorados en este trabajo, produzcan esta diferencia en el efecto modulador en la  
353 secreción de TNF $\alpha$ .

## 354 5. Conclusión

355 El estudio *in vitro* de la influencia de la variedad geográfica en las funciones  
356 inmunomoduladoras del cacao sobre esplenocitos llevado a cabo permitió, por una parte, determinar  
357 que las variedades de cacao ensayadas presentaban cierta homogeneidad en cuanto a su contenido  
358 total de polifenoles, siendo el cacao P07 el que tenía los niveles más elevados, y confirmar que la dosis  
359 de los extractos de cacao ensayadas no suponía un efecto negativo en la viabilidad celular. Por otra  
360 parte, los cacaos P07 y P09 consiguieron un efecto significativo en la regulación negativa de la  
361 producción de IL-10. No obstante, en cuanto a la regulación negativa en la producción de TNF $\alpha$ ,  
362 solamente el cacao P09 consiguió un efecto significativo en comparación con el P01. Así, se demuestra  
363 la importancia de la variedad geográfica en los efectos inmunomoduladores del cacao.

364

365 **Agradecimientos:** Me gustaría agradecer al Dr. Pérez Cano, Marta Periz, Dra. Massot y a todo el grupo de  
366 "Autoimmunitat i tolerància" de la sección de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de  
367 la Alimentación de la Universidad de Barcelona, por su apoyo en este último año que me ha permitido la  
368 realización de mi trabajo final de grado.

369 **Conflictos de Interés:** El autor declara no tener conflicto de intereses.

370

371

372



373 **Referencias**

- 374 1. Respuesta inmunitaria: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [citad 27 abril 2019]. Disponible a:  
375 <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000821.htm>
- 376 2. Irimia D, Wang X. Inflammation-on-a-Chip: Probing the Immune System Ex Vivo. Trends Biotechnol  
377 [Internet]. 1 setembre 2018 [citad 27 abril 2019];36(9):923-37. Disponible a: [https://www-cell-](https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(18)30095-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779918300957%3Fshowall%3Dtrue)  
378 [com.sire.ub.edu/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(18\)30095-](https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(18)30095-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779918300957%3Fshowall%3Dtrue)  
379 [7?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779918300957%](https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(18)30095-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779918300957%3Fshowall%3Dtrue)  
380 [3Fshowall%3Dtrue](https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(18)30095-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779918300957%3Fshowall%3Dtrue)
- 381 3. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado J de D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel  
382 Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. Olszewski MA, editor. PLoS One [Internet]. 23  
383 desembre 2015 [citad 23 gener 2019];10(12):e0145342. Disponible a:  
384 <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145342>
- 385 4. Ramos-Romero S. Influencia de la ingesta de cacao en la respuesta inflamatoria aguada y crónica  
386 inducida en rata. Universidad de Barcelona; 2011.
- 387 5. AKDIS CA, JOSS A, AKDIS M, FAITH A, BLASER K. A molecular basis for T cell suppression by IL-  
388 10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol  
389 3-kinase binding. FASEB J [Internet]. 24 setembre 2000 [citad 8 maig 2019];14(12):1666-8. Disponible a:  
390 <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.99-0874fje>
- 391 6. Dong L-M, Chen X-W, He X-X, Jiang X-P, Wu F. Cell division cycle protein 42 regulates the  
392 inflammatory response in mice bearing inflammatory bowel disease. Artif Cells, Nanomedicine,  
393 Biotechnol [Internet]. 4 desembre 2019 [citad 8 maig 2019];47(1):1833-8. Disponible a:  
394 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2019.1596936>
- 395 7. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. Br J Nutr [Internet]. 6 abril 2009  
396 [citad 16 gener 2019];101(07):931. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126261>
- 397 8. Dugo L, Belluomo MG, Fanali C, Russo M, Cacciola F, Maccarrone M, et al. Effect of Cocoa  
398 Polyphenolic Extract on Macrophage Polarization from Proinflammatory M1 to Anti-Inflammatory M2  
399 State. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2017 [citad 25 gener 2019];2017:6293740. Disponible a:  
400 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28744339>
- 401 9. Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T. Polyphenols in Chocolate, Which Have Antioxidant Activity,  
402 Modulate Immune Functions in Humans in Vitro. Cell Immunol [Internet]. 1 maig 1997 [citad 18 abril  
403 2019];177(2):129-36. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178639>
- 404 10. Mao TK, Powell JJ, Water JA Van de, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. International journal of  
405 immunotherapy. [Internet]. Vol. 15, International Journal of Immunotherapy. Bioscience Ediprint Inc;  
406 1985 [citad 18 abril 2019]. 23-29 p. Disponible a:  
407 [https://ucdavis.pure.elsevier.com/en/publications/influence-of-cocoa-procyanidins-on-the-](https://ucdavis.pure.elsevier.com/en/publications/influence-of-cocoa-procyanidins-on-the-transcription-of-interleuk)  
408 [transcription-of-interleuk](https://ucdavis.pure.elsevier.com/en/publications/influence-of-cocoa-procyanidins-on-the-transcription-of-interleuk)

- 409 11. Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Permanyer J, Franch À, et al. Influence of  
410 a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res*  
411 [Internet]. març 2009 [citat 19 abril 2019];53(3):389-97. Disponible a:  
412 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925611>
- 413 12. Abril-Gil M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Effect of a cocoa-enriched diet on immune response  
414 and anaphylaxis in a food allergy model in Brown Norway rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. gener 2016  
415 [citat 24 gener 2019];27:317-26. Disponible a:  
416 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286315002739>
- 417 13. Pérez-Berezo T, Ramírez-Santana C, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, et al.  
418 Effects of a cocoa diet on an intestinal inflammation model in rats. *Exp Biol Med* [Internet]. 1 octubre  
419 2012 [citat 22 maig 2019];237(10):1181-8. Disponible a:  
420 <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/ebm.2012.012083>
- 421 14. Rodríguez-Lagunas M, Vicente F, Pereira P, Castell M, Pérez-Cano F, Rodríguez-Lagunas MJ, et al.  
422 Relationship between Cocoa Intake and Healthy Status: A Pilot Study in University Students.  
423 *Molecules* [Internet]. 23 febrer 2019 [citat 25 juny 2019];24(4):812. Disponible a:  
424 <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/4/812>
- 425 15. Rees A, Dodd GF, Spencer JPE. The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of  
426 Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients* [Internet]. 1  
427 desembre 2018 [citat 19 abril 2019];10(12). Disponible a:  
428 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30513729>
- 429 16. Álvarez C, Pérez E, Cros E, Lares M, Assemat S, Boulanger R, et al. The Use of near Infrared  
430 Spectroscopy to Determine the Fat, Caffeine, Theobromine and (-)-Epicatechin Contents in  
431 Unfermented and Sun-Dried Beans of Criollo Cocoa. *J Near Infrared Spectrosc* [Internet]. 1 abril 2012  
432 [citat 2 maig 2019];20(2):307-15. Disponible a: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1255/jnirs.990>
- 433 17. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chem* [Internet]. 1 gener  
434 2006 [citat 27 abril 2019];98(4):649-57. Disponible a: [https://www.sciencedirect-](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605005637)  
435 [com.sciencedirect-](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605005637)
- 436 18. Christine Counet, Caroline Ouwerx, Delphine Rosoux and, Collin\* S. Relationship between  
437 Procyanidin and Flavor Contents of Cocoa Liquors from Different Origins. 2004 [citat 27 abril 2019];  
438 Disponible a: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf040105b>
- 439 19. Nicola M. Treball Dirigit Evaluación del efecto inmunomodulador “ in vitro ” de diferentes variedades  
440 de cacao Mariano Nicola Llorente. 2019;
- 441 20. Emma Ramiro †, Àngels Franch †, Cristina Castellote †, Francisco Pérez-Cano †, Joan Permanyer ‡,  
442 Maria Izquierdo-Pulido ‡ and, et al. Flavonoids from Theobroma cacao Down-Regulate Inflammatory  
443 Mediators. 2005 [citat 22 gener 2019]; Disponible a: [https://pubs-ac-](https://pubs-ac-sire.ub.edu/doi/full/10.1021/jf0511042)  
444 [sire.ub.edu/doi/full/10.1021/jf0511042](https://pubs-ac-sire.ub.edu/doi/full/10.1021/jf0511042)

- 445 21. Camps Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch i Masferrer À, Untersmayr E, Castell M. Effect of cocoa,  
446 cocoa polyphenols, theobromine and hesperidin on the gene expression of tight junction proteins in  
447 Caco-2 cells. 16 novembre 2017 [citat 25 gener 2019]; Disponible a:  
448 <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/119238>
- 449 22. Downer EJ, Jones RS, McDonald CL, Greco E, Brennan S, Connor TJ, et al. Identifying Early  
450 Inflammatory Changes in Monocyte-Derived Macrophages from a Population with IQ-Discrepant  
451 Episodic Memory. López-Lluch G, editor. PLoS One [Internet]. 6 maig 2013 [citat 25 gener  
452 2019];8(5):e63194. Disponible a: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063194>
- 453 23. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. J Nutr Biochem [Internet]. 1  
454 agost 2008 [citat 11 juny 2019];19(8):555-65. Disponible a: [https://www.sciencedirect-](https://www.sciencedirect.com.sire.ub.edu/science/article/pii/S0955286307001842?via%3Dihub)  
455 [com.sire.ub.edu/science/article/pii/S0955286307001842?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com.sire.ub.edu/science/article/pii/S0955286307001842?via%3Dihub)
- 456 24. Ramiro E, Franch À, Castellote C, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Effect of  
457 *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. Br J Nutr [Internet]. 8 juny  
458 2005 [citat 23 juny 2019];93(6):859-66. Disponible a:  
459 [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114505001315/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114505001315/type/journal_article)
- 460 25. Bijjiga E, Martino AT. Interleukin 10 (IL-10) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences. J Clin  
461 Cell Immunol [Internet]. 1 febrer 2011 [citat 25 juny 2019];1-6. Disponible a:  
462 [https://www.omicsonline.org/interleukin-il-regulatory-cytokine-and-its-clinical-consequences-2155-](https://www.omicsonline.org/interleukin-il-regulatory-cytokine-and-its-clinical-consequences-2155-9899-S1-007.php?aid=11113)  
463 [9899-S1-007.php?aid=11113](https://www.omicsonline.org/interleukin-il-regulatory-cytokine-and-its-clinical-consequences-2155-9899-S1-007.php?aid=11113)
- 464 26. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J, et  
465 al. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. Clin Exp Immunol [Internet].  
466 setembre 2007 [citat 25 juny 2019];149(3):535-42. Disponible a:  
467 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565606>
- 468 27. Al-Hanbali M, Ali D, Bustami M, Abdel-Malek S, Al-Hanbali R, Alhussainy T, et al. Epicatechin  
469 suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production with NF-kappaB nuclear translocation in whole  
470 blood stimulated system. Neuro Endocrinol Lett [Internet]. març 2009 [citat 23 juny 2019];30(1):131-8.  
471 Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300393>
- 472 28. Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on  
473 peripheral blood mononuclear cells. Exp Biol Med (Maywood) [Internet]. febrer 2007 [citat 23 juny  
474 2019];232(2):293-300. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259337>
- 475 29. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic Biol Med [Internet]. 1 abril 2004 [citat 24  
476 juny 2019];36(7):838-49. Disponible a: [https://www.sciencedirect-](https://www.sciencedirect.com.sire.ub.edu/science/article/pii/S0891584904000334?via%3Dihub)  
477 [com.sire.ub.edu/science/article/pii/S0891584904000334?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com.sire.ub.edu/science/article/pii/S0891584904000334?via%3Dihub)
- 478 30. Luo X-D, Basile MJ, Kennelly EJ. Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of *Chrysophyllum cainito*  
479 L. (Star Apple). 2002 [citat 24 juny 2019]; Disponible a: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf011178n>