



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



---

---

## PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

### TESIS

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIO Y  
ANTIARTRÍTICO DEL ACEITE DE SEMILLA DE AGUACATE MEXICANO  
(*Persea americana* var. *drymifolia*)

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

QUE PRESENTA:

**IIA. BARUC MARIO ZAVALA GUERRERO**

Director de Tesis

**D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**Morelia, Michoacán; mayo 2020**

**LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN Y ASESORÍA DEL DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA. ES PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN APOYADO POR LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CIC 2.10 RSG 2018-2020), REGISTRO DE BECARIO CONACYT 701049.**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UMSNH**



**LAB. BIOTECNOLOGÍA  
VEGETAL**

## DEDICATORIA

*A mis padres, por ser la base y la inspiración para la superación personal, por todo el apoyo que me han brindado, dando ejemplo sobre lo que se propone, se puede lograr en contra de las adversidades.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria (Facultad de Químico Farmacobiología) por permitirme el ingreso a este posgrado y brindarme las facilidades para realizar mis estudios. También al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, donde se desarrolló la investigación.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de la maestría.

A mi director de tesis, al Dr. Rafael Salgado Garciglia por darme la oportunidad de trabajar a su lado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por haber confiado en mí para realizar esta investigación, por compartir su conocimiento y experiencia.

Agradezco al comité sinodal, Dr. Alfredo Saavedra Molina, Dra. Patricia Ríos Chávez, Dra. Esperanza Meléndez Herrera, Dr. Joel Edmundo López Meza que, gracias a sus correcciones y aportaciones me fue posible llegar hasta aquí.

A la M.C. Alejandra Hernández García, responsable técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal, le agradezco sus atenciones para desarrollar los procedimientos y el buen trabajo del laboratorio.

A la Biól. Madeline Hernández Rebollar, por su enseñanza en el manejo y cuidado de animales del bioterio, al Sr. Efraín González V., encargado del mantenimiento del bioterio.

A mis compañeros de los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Bioquímica, agradeciendo su amistad, al Dr. Rafael Torres Martínez, por el apoyo en el trabajo experimental, a mis compañeros de maestría Biol. Jessica Osiris Raya Rodríguez y al IBQ. Luis Alfonso Sereno Villaseñor por su amistad y trabajo, también a mis compañeros y amigos de laboratorio

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>ABREVIATURAS</b>	<i>i</i>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<i>ii</i>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<i>iii</i>
<b>RESUMEN</b>	<i>v</i>
<b>ABSTRACT</b>	<i>vi</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. Estrés oxidante e inflamación	4
2.1.1. Radicales libres	4
2.1.2. Proceso inflamatorio	5
2.1.3. Enfermedades relacionadas con estrés oxidante e inflamación	7
2.1.4. Ensayos <i>in vitro</i> para determinar actividad antioxidante y antiinflamatoria	9
2.2. Artritis reumatoide	11
2.2.1. Relación entre estrés oxidante, inflamación y artritis reumatoide	13
2.2.2. Tratamiento de la artritis reumatoide	14
2.2.3. Ensayos <i>in vitro</i> para determinar actividad antiartrítica	16
2.3. Antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal	18
2.3.1. Antioxidantes	18
2.3.2. Antiinflamatorios	19
2.3.3. Antiartríticos	20
2.4. Aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> )	21
2.4.1. Antecedentes directos	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>4. HIPÓTESIS</b>	26
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	27
5.1. Objetivos específicos	27
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	28
<b>7. RESULTADOS</b>	29
7.1. <b>Capítulo I.</b> Actividad antioxidante del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) y su relación con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides totales.	29

	Pág.
7.2. <b>Capítulo II.</b> Determinación de la actividad antiinflamatoria del aceite de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) y la fracción metanólica en un modelo experimental de inflamación aguda e identificación de principales compuestos activos.	43
7.3. <b>Capítulo III.</b> Efecto antiinflamatorio y antiartrítico del aceite y la fracción metanólica de la semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) en ratas artríticas.	61
<b>8. DISCUSIÓN GENERAL</b>	74
<b>9. CONCLUSIÓN GENERAL</b>	83
<b>10. LITERATURA GENERAL CITADA</b>	84
<b>11. ANEXOS</b>	92

## ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
ABTS●+	2,2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolín-6-ácido sulfónico
AIES	Antiinflamatorios esteroideos
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
$\text{AlCl}_3$	Cloruro de aluminio
AR	Artritis reumatoide
Bcl10	Gen codificador proteico activador de células B
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$	Acetato de potasio
COX-1	Prostaglandina-endoperóxido sintasa
COX-2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
DFM/ $\text{MgCO}_3$	Dimetilformamida/carbonato de magnesio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente a ácido gálico
EL	Equivalente a luteína
EQ	Equivalentes a quercetina
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FARMES	Anti-reumáticos Modificadores de la Enfermedad
FR	Factor reumatoide
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
$\text{IC}_{50}$	Concentración inhibitoria al 50%
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelulares
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
LDL	Lípidos de baja densidad
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MAPK p38	Proteínas cinasas p38 activadas por mitógenos
MeOH	Metanol
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Carbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
$\text{NaSO}_4$	Sulfato de sodio
NF- $\kappa$ B	Factor Nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
$\text{NO}_2$	Dióxido nítrico
Nrf2	Factor nuclear (derivado de eritroide 2)
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Anión superóxido
$\text{OH}^{\cdot}$	Radical hidroxilo
ONOO-	Peroxinitrito
PGE2	Prostaglandina E2
RO	Radical alcoxilo lipídico
ROO	Radical lipídico peroxilo
ROOH	Hidroperóxido lipídico
RS	Radical tiol
TAC	Capacidad antioxidante total
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos reconocidos para artritis reumatoide.	15
<b>Cuadro 2.</b> Ejemplos de plantas fuente de compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria.	20
<b>Cuadro 3.</b> Compuestos fenólicos de la solución de mezcla de estándares, analizados por HPLC (10 µg/mL).	53
<b>Cuadro 4.</b> Contenido de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) y de la fracción metanólica.	54
<b>Cuadro 5.</b> Contenido de ácidos grasos y derivados identificados y cuantificados por CG-EM del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> ).	56
<b>Cuadro 6.</b> Índice de niveles artríticos.	65
<b>Cuadro 7.</b> Índices de artritis durante el establecimiento y tratamiento con el aceite y la fracción metanólica de semillas de aguacate nativo mexicano.	67
<b>Cuadro 8.</b> Marcadores bioquímicos e inmunológicos en suero de ratas Wistar macho artríticas.	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Proceso inflamatorio.	7
<b>Figura 2.</b> Proceso inflamatorio en artritis raumatoide	12
<b>Figura 3.</b> Frutos característicos de aguacate nativo mexicano ( <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> ).	22
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de actividad antioxidante por el método DPPH (a), ABTS (b) y TAC (c) del aceite de semilla de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> y de las fracciones metanólica (MeOH) y de cloroformo, comparadas con la del butilhidroxitolueno (BHT) y Trolox, a una concentración de 1 mg/mL.	35
<b>Figura 5.</b> Determinación de ácidos fenólicos totales ( $\mu$ moles equivalentes a ácido gálico/mg p.f.) (a), de flavonoides totales ( $\mu$ moles equivalentes a quercetina/mg p.f.) (b) y de carotenoides totales (miligramos equivalentes a luteína/Kg p.f.) (c), del aceite de semilla de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> y las fracciones metanólica (MeOH) y de cloroformo.	38
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de actividad antiinflamatoria del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) administrado de manera tópica en tres dosis: a) 0.1; b) 1; c) 10 mg/kg. Control de inflamación sin tratamiento (ST), control de inflamación tratado con 25 mg/kg de ibuprofeno (Ibu) y control de inflamación tratado con aceite mineral (AM).	49
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de actividad antiinflamatoria de la fracción metanólica del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) administrado de manera tópica en tres dosis: 0.1 (a), 1 (b) y 10 (c) mg/kg. Control de inflamación sin tratamiento (ST), control de inflamación tratado con 25 mg/kg de Ibuprofeno (Ibu) y control de inflamación tratado con dimetilsulfóxido (DMSO 5%).	51
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de actividad antiinflamatoria con administración oral en dosis única de 1 mg/kg durante 28 días, del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) (a) y de la fracción metanólica de éste (b). Control de inflamación sin tratamiento (ST), control de inflamación tratado con 25 mg/kg de ibuprofeno (Ibu), control de inflamación tratado con dimetilsulfóxido (DMSO 5%) y control de inflamación tratado con aceite mineral (AM).	52
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de la solución mezcla estándar de compuestos fenólicos analizados por HPLC.	54

	Pág.
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> ), obtenido por cromatografía de gases.	57
<b>Figura 11.</b> Fotografía donde se muestra la forma de administración de la emulsión para la inducción de artritis.	65
<b>Figura 12.</b> Fotografías representativas de signos desde el inicio de la inducción de la artritis reumatoide experimental en ratas Wistar macho.	68
<b>Figura 13.</b> Diagrama general que describe la relación entre la actividad antioxidante <i>in vitro</i> , antiinflamatoria y antiartrítica, con la aplicación del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) y la fracción metanólica obtenida de éste, debido a los principales compuestos identificados. FR, factor reumatoide; PCR, proteína C reactiva.	80

## RESUMEN

En esta investigación, se evaluó la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica del aceite de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). La actividad antioxidante fue determinada con los métodos DPPH, ABTS y TAC, en el aceite de semilla obtenido con hexano y las fracciones de distinta polaridad (fracción metanólica y fracción clorofórmica) a una concentración de 1 mg/mL, a las que también se les determinó el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides. La capacidad antiinflamatoria, fue evaluada por el método de edema de pata en ratas Wistar inducido por carragenina mediante la administración de 50  $\mu$ L del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de la fracción metanólica, ya que ésta fue la de mayor actividad antioxidante, en una dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg, con administración tópica y oral (tratamiento por 28 días), en las que se cuantificaron e identificaron los principales compuestos de tipo fenólico y ácidos grasos o derivados, utilizando HPLC y CG-EM. La capacidad antiartrítica fue demostrada con el modelo de inducción de artritis por adyuvante incompleto de Freund y por colágeno II, en ratas macho Wistar, administrando vía oral 50  $\mu$ L del aceite de semilla y de la fracción metanólica por 28 días, en una dosis única de 1 mg/kg. El efecto antiartrítico fue evaluado mediante un índice de artritis del 0 al 4, donde 0 es sin síntomas y 4, síntomas completos de la enfermedad. Aunque con el método de DPPH, la mayor actividad antioxidante fue mostrada por la fracción clorofórmica y el aceite de semilla (91.4% y 90%, respectivamente), la fracción metanólica alcanzó una alta actividad antioxidante tanto con el método ABTS (99.7%) como con TAC (80.8%), presentando valores de IC<sub>50</sub> de 0.035 mg/mL y de 0.153 mg/mL, respectivamente. Esta fracción y el aceite de semilla fueron considerados como los de mayor actividad antioxidante, encontrando en la fracción metanólica, el mayor contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides totales (0.17  $\mu$ moles EAG/mg p.f., 5.49  $\mu$ moles EQ/mg p.f. y 2.35 mg EL/kg p.f., respectivamente). La actividad antiinflamatoria con la aplicación tópica se demostró tanto con el aceite de semilla de aguacate (70.85%) como con la fracción metanólica (72.21%) a una dosis 1 mg/kg, a las 8 h, valores que fueron más altos que lo observado con ibuprofeno (39.61%). La actividad antiinflamatoria por administración oral, se determinó con solo una dosis, la de mayor efecto antiinflamatorio por administración tópica (1 mg/kg), encontrando a las 8 h después de la inducción de la inflamación, una actividad mayor con el aceite de semilla (68.6%), la fracción metanólica presentó solamente un 46.7%, aunque fueron valores más altos que lo mostrado por ibuprofeno (17.63%). A partir de los 10 días del tratamiento después de la inducción de la artritis, se observó una disminución del edema en la pata, con el aceite de semilla y la fracción metanólica, con valores de 5.89mm y 6.87mm, respectivamente, en comparación con la alta inflamación que mostraron las ratas artríticas no tratadas (8.4mm). A los 28 días, con el aceite de semilla se mantuvo un índice artrítico de 2, con la fracción metanólica de 3, similar a los observado con la administración de dexametasona (0.01 mg/kg), registrando éstos una disminución de los síntomas artríticos típicos de la enfermedad en comparación con las ratas artríticas, las que mostraron los síntomas artríticos en ambas extremidades, inflamación en todas las articulaciones de las patas posteriores e inflamación masiva en dichas extremidades, alcanzando el índice máximo de 4. En ratas artríticas tratadas con el aceite de semilla y la fracción metanólica, se mantuvieron los niveles aceptables de glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol, triacilglicéridos, disminuyendo los valores del factor reumatoide y la proteína C reactiva, lo que sugiere un control de la enfermedad previniendo posibles daños a hígado y riñón. En las ratas artríticas no tratadas, la inflamación y el desarrollo de la enfermedad se relacionaron con los niveles altos de ácido úrico, creatinina y colesterol total, así como del factor reumatoide y la proteína C reactiva. Con el análisis de identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos, ácidos grasos y sus derivados, se sugiere que ambos tipos de compuestos son los responsables de la actividad antiinflamatoria y antiartrítica. Con estos resultados se demostró una relación directa entre la actividad antioxidante, la antiinflamatoria y la antiartrítica, que ejercen los compuestos del aceite de semilla y la fracción metanólica de la semilla del aguacate nativo mexicano.

**Palabras clave:** Aguacate nativo mexicano, antiartríticos, antiinflamatorios, antioxidantes, compuestos bioactivos.

## ABSTRACT

In this research, the antioxidant, anti-inflammatory and anti-arthritis activity of native Mexican avocado oil (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) was evaluated. Antioxidant activity was determined by DPPH, ABTS and TAC methods, in seed oil obtained with hexane and fractions of different polarity (methanolic and chloroformic fraction) at a concentration of 1 mg/mL, which were also determined the total content of phenolic acids, flavonoids and carotenoids. The anti-inflammatory capacity was evaluated by the method of paw edema in carrageenan-induced Wistar rats by administering 50 $\mu$ L of the native Mexican avocado seed oil and the methanolic fraction, since this was the most antioxidant activity, at a dose of 0.1, 1 and 10 mg/kg, with topical and oral administration (treatment for 28 days), in which the main compounds of phenolic type and fatty acids or derivatives, used HPLC and GC-MS, were quantified and identified. The antiarthritic capacity was demonstrated in an arthritis induction model, using Freund incomplete adjuvant and collagen II in Wistar male rats, administering orally 50 $\mu$ L of seed oil and the methanolic fraction for 28 days, in a single dose of 1 mg/kg. The antiarthritic effect was evaluated by an arthritis index of 0 to 4, where 0 is symptomless and 4 is complete symptoms of the disease. Although with the DPPH method, the highest antioxidant activity was shown by the chloroformic fraction and seed oil (91.4% and 90%, respectively), the methanolic fraction achieved high antioxidant activity with both the ABTS method (99.7%) and TAC (80.8%), presenting IC<sub>50</sub> values of 0.035 mg/mL and 0.153 mg/mL, respectively. This fraction and seed oil were considered to be the most antioxidant, found in the methanolic fraction, the highest total content of phenolic acids, flavonoids and carotenoids (0.17  $\mu$ moles EAG/mg f.w., 5.49  $\mu$ moles EQ/mg f.w. and 2.35 mg EL/kg f.w., respectively). Anti-inflammatory activity with topical application was demonstrated with both avocado seed oil (70.85%) as methanolic fraction at a dose of 1 mg/kg, at 8 h after inflammation induction, values that were higher than observed with ibuprofen (39.61%). Anti-inflammatory activity by oral administration, was determined with only one dose, the most anti-inflammatory effect by topical administration (1 mg/kg), finding at 8 h after inflammation induction, a higher activity with seed oil (68.6%), the methanolic fraction had only 46.7%, although they were higher values than what was shown by ibuprofen (17.63%). From 10 days of treatment after arthritis induction, a decrease in paw edema was observed, with seed oil and methanolic fraction, with values of 5.89 mm and 6.87 mm, respectively, compared to the high inflammation shown by untreated arthritic rats (8.4mm). At 28 days, with seed oil, an arthritic index of 2 was maintained, while with the methanolic fraction was 3, similar to those observed with dexamethasone administration (0.01 mg/kg), these showed a decrease in arthritic symptoms typical of the disease compared to arthritic rats, which showed arthritic symptoms in both extremities, inflammation in all hind legs joints and massive inflammation in these extremities, reaching the maximum rate of 4. In arthritic rats treated with seed oil and the methanolic fraction, acceptable levels of glucose, urea, uric acid, creatinine, cholesterol, triacyl glycerides were maintained, decreasing rheumatoid factor and C-reactive protein values, which suggesting disease control preventing possible liver and kidney damage. In untreated arthritic rats, inflammation and development of the disease were related to high levels of uric acid, creatinine and total cholesterol, as well as rheumatoid factor and C-reactive protein. With the analysis of identification and quantification of phenolic compounds, fatty acids and their derivatives, it is suggested that both types of compounds are responsible for anti-inflammatory and antiarthritic activity. These results demonstrated a direct relationship between antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic activity, which exert the compounds of seed oil and methanolic fraction of native Mexican avocado seeds.

**Keywords:** Antiarthritic, anti-inflammatory, antioxidant, bioactive compounds, native Mexican avocado.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad, es de gran importancia la búsqueda de agentes antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas que cursan con estrés oxidante e inflamación, como la diabetes, hipertensión, cáncer y artritis, entre otras, ya que es necesario implementar dietas efectivas con alimentos o productos derivados de éstos, que sean utilizados como tratamientos preventivos y curativos, realizando estudios con rigor científico, para llegar a proponer alimentos funcionales o nutraceuticos más accesibles (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013; González-Jiménez, *et al.*, 2015)

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones, produciendo una destrucción progresiva con deformidad, es considerada una de las enfermedades en la que los procesos de inflamación se encuentran alterados, por lo que se considera un óptimo modelo para realizar investigaciones que determinen un claro efecto entre la actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como el efecto antiartrítico, con la administración de extractos o aceites derivados de plantas (Matveicov *et al.*, 1994; Alhambra-Expósito *et al.*, 2013).

Las plantas son una alternativa debido a que producen metabolitos secundarios de diversas estructuras químicas como los terpenoides, fenólicos y polifenoles, y los alcaloides, que tienen actividad antioxidante. Un gran número de éstos reducen la inflamación y son producidos en diferentes partes de las plantas como hojas, tallos, flores, raíces y en los últimos años se han reportado los efectos antiinflamatorios de extractos de frutos como las frutillas (zarzamora, fresa, arándanos y frambuesas), uvas, cítricos, piña, y manzana entre otros, así como de aceites de semillas como linaza, chía, oliva y nuez (Caballero *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2017).

El efecto patológico de las especies reactivas de oxígeno en artritis reumatoide ha sido bien documentado (Matveicov *et al.*, 1994), ya que se ha demostrado que un aumento en la ingesta de antioxidantes en pacientes que padecen dolores artríticos,

la inflamación disminuye, así como la degeneración de la articulación y el cartílago dañado. Así mismo, el consumo de antioxidantes, especialmente vitamínicos, reduce el riesgo de pérdida de cartílago y el riesgo de progresión de la osteoartritis. El consumo de alimentos o productos de éstos con propiedad antioxidante, lleva al planteamiento que la ingesta de antioxidantes puede disminuir o contrarrestar los procesos antiinflamatorios que ocurren durante el desarrollo de la artritis (Guerra, 1997; Cerhan *et al.* 2003; Alhambra-Expósito *et al.*, 2013).

En particular, el aceite de aguacate (*Persea americana* Mill.), principalmente del cultivar Hass, presenta actividad antioxidante, antidiabética, analgésica, anticancerígena, antihipertensiva y antihiperlipidémica, debido a sus principales componentes como los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico, vitaminas A, D y E, polifenoles, carotenoides, terpenoides y fitoesteroles (Caballero *et al.*, 2014; Carvajal *et al.*, 2014; Dreher y Davenport, 2014). Estos estudios se han realizado con métodos *in vitro*, así como en sistemas *in vivo*, utilizando cultivos celulares o tejidos y animales u órganos íntegros (Ortiz-Avila *et al.*, 2015). Además, el aceite de frutos de aguacate tanto de la pulpa (mesocarpio) como de la semilla poseen actividad antiinflamatoria, del que se han identificado compuestos no saponificables del aceite de aguacate, que han demostrado tener efectos antiinflamatorios, relacionados con el desarrollo del cáncer (Carvajal *et al.*, 2014) y sobre inflamación local en piel con la reducción de interleucinas como la IL-6 y prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), moléculas marcadoras de la inflamación (Rosenblat *et al.*, 2011).

En nuestro grupo de trabajo se ha determinado la actividad antimicrobiana y antioxidante y antiinflamatoria de diversos extractos de hojas, tallos, frutos y semillas de aguacate nativo mexicano (Valdez, 2011; Negrete, 2011; Báez-Magaña, 2014; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Castro-Mercado, 2016), así como propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, lo cual muestra potencial para el tratamiento de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Sin embargo, no se han realizado estudios con el aceite obtenido de la semilla de este

fruto, dirigidos a determinar la actividad antioxidante y su relación con las propiedades antiinflamatorias y antiartríticas.

Los frutos y diferentes partes del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) han sido utilizados desde hace cientos de años en la medicina tradicional mexicana, los Purépechas de la Meseta y del Lago de Pátzcuaro (Michoacán) usan los frutos de esta planta como antidiabético, analgésico, para el tratamiento de desórdenes intestinales y como antiinflamatorio (Bello-González *et al.*, 2015).

Por lo anterior y debido a las propiedades que se les atribuyen a los frutos de aguacate, es importante realizar estudios con el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) para determinar su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, y determinar los grupos de compuestos responsables de esta actividad, objetivo principal de esta investigación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN

#### 2.1.1. Radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) son radicales libres generados por procesos celulares y radiación ionizante, las más estudiadas son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Otros radicales importantes son el hidroperóxido lipídico (ROOH), radical lipídico peroxilo (ROO) y el radical alcoxilo lipídico (RO) que se asocian con la membrana lipídica. El óxido nítrico (NO), dióxido nítrico ( $NO_2$ ) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), son algunas especies reactivas de nitrógeno; con azufre, está el radical tiol (RS) que forma electrones desapareados con átomos de sulfuro (Kurutas *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007).

Muchos de estos radicales libres están relacionados con la aparición de diversas enfermedades o se producen durante el desarrollo de éstas. La formación de radicales libres ocurre a través de varios mecanismos que involucran factores endógenos y ambientales. El anión superóxido se produce mediante la adición de un solo electrón al oxígeno y existen varios mecanismos por los cuales se puede producir superóxido *in vivo*. El estrés oxidante y el estrés nitrosativo es parte del metabolismo de los organismos aeróbicos, que cuando existe un desequilibrio por un elevado nivel de radicales libres y una disminución de la capacidad antioxidante, se provoca un daño en las estructuras celulares, como en los lípidos de membrana, carbohidratos, proteínas y el ADN, lo que provoca cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula. Cuando estos radicales libres son producidos en niveles bajos y moderados, éstos funcionan como señales moleculares que regulan diversos procesos, como la defensa contra agentes infecciosos (Gershman *et al.*, 1954).

Si no hay un control en el equilibrio de éstos, ocurre daño celular o tisular que lleva a causar la aparición de enfermedades que cursan con estrés oxidante e inflamación, en las que la viabilidad celular es comprometida para inducir la muerte celular por necrosis o apoptosis (Gershman *et al.*, 1954; Bielski *et al.*, 1995).

### **2.1.2. Proceso inflamatorio**

El proceso inflamatorio puede clasificarse según el tiempo de duración, en agudo que resulta de una evolución relativamente breve que puede durar de horas hasta unos días, caracterizado por exudación de líquido, aumento de proteínas plasmáticas (generando edema), migración de leucocitos (principalmente neutrófilos), entre otros; y en crónico, que resulta de mayor duración desde semanas hasta meses, caracterizado generalmente por proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis, necrosis tisular y por consecuente pérdida de la función permanente (Garrote y Bonet, 2003; Ribeiro *et al.*, 2015).

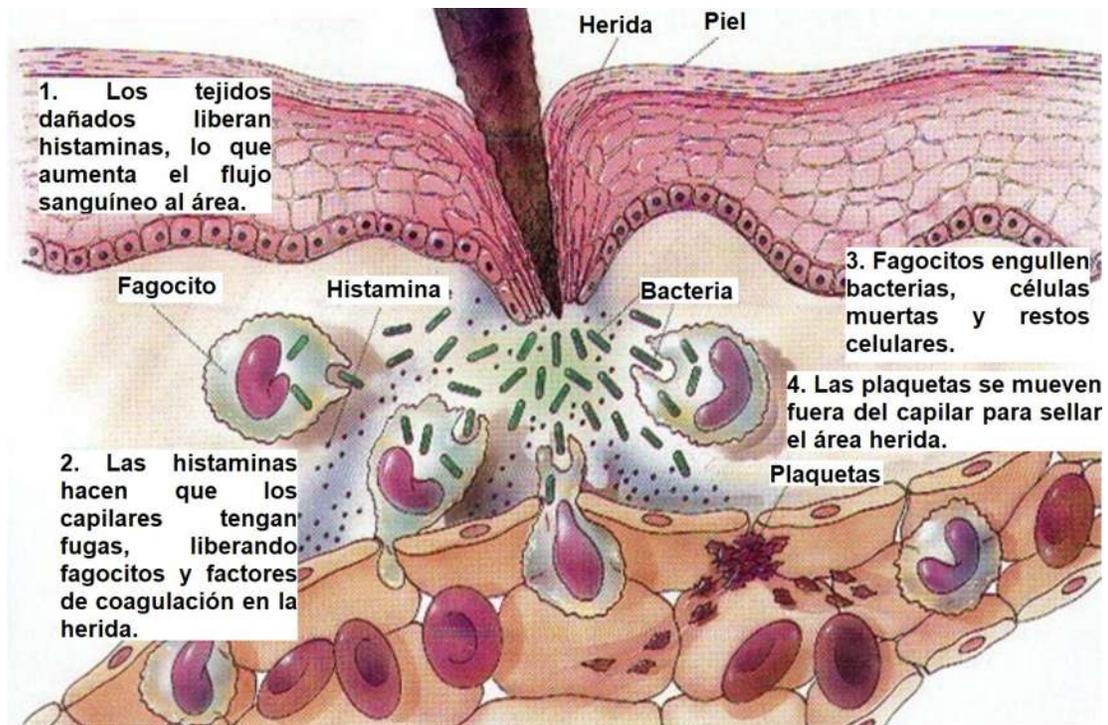
La sobreproducción de ERO y/o ERN producidas durante procesos inflamatorios conduce a la progresión de la respuesta inflamatoria, donde al estar aumentadas, éstas generan daño en el área inflamada, generando una respuesta inflamatoria mayor, desarrollando un ciclo sin fin, por lo que es importante controlar dicha respuesta para evitar daños (Ribeiro *et al.*, 2015).

La inflamación es un proceso tisular generado por procesos moleculares, celulares y vasculares con finalidad defensiva contra a agresiones físicas, químicas o biológicas. La magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial ya que una respuesta inflamatoria insuficiente resulta en inmunodeficiencia, lo cual puede conducir desde una infección hasta cáncer. Por otro lado, una excesiva respuesta inflamatoria causa morbilidad y mortalidad en enfermedades tales como, arteriosclerosis, trombosis, enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, entre otras (Nathan, 1987; Gómez *et al.*, 2007).

En el proceso general de la inflamación, intervienen diversos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización y de la activación de los factores de complemento como las aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citocinas, factores de crecimiento, factores activadores, factores de complemento, anticuerpos, entre otros), especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, hidroperóxido, radicales hidroxilos) y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoïdes, leucotrienos) (Nathan, 2002).

Además de un gran número de mediadores proinflamatorios, la complejidad de tales procesos son incrementados adicionalmente por la participación de mecanismos antiflogísticos e inmunomodulatorios, algunos miembros de mediadores pueden actuar como antiinflamatorios, como las lipoxinas de los productos de la cascada del ácido araquidónico o diversas citocinas como las interleucinas (IL) que ejercen acciones pro- y antiinflamatorias, dependiendo de su participación en la respuesta inmunespecífica (Gómez *et al.*, 2007).

La respuesta inflamatoria inicia con el reclutamiento de diversas células para contrarrestar cualquier agente dañino, éstas son propias del sistema inmune y liberan distintos mediadores inflamatorios como el caso de los fagocitos, que liberan el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) (al medio intracelular), citocinas proinflamatorias como algunas interleucinas, moléculas de quimiotaxis y ERO y/o ERN. Los mastocitos liberan en mayor medida histamina que funciona como vaso dilatador, facilitando la llegada y el reclutamiento de otras células del sistema inmune. La heparina, las citocinas, factores de crecimiento y moléculas proinflamatorias generadas por el ciclo del ácido araquidónico como prostaglandinas y ciclooxigenasas, y los neutrófilos, generan ERO que aumenta el daño y el proceso inflamatorio (Figura 1).



**Figura 1.** Proceso inflamatorio. El proceso inflamatorio surge con una lesión siendo un estímulo exógeno o endógeno, el que genera síntomas como rubor, tumor, calor, dolor e impotencia funcional. La reacción del tejido conectivo se denomina inflamación y se caracteriza por la acumulación de líquido y aumento de leucocitos en tejidos extracelulares con el fin de generar la reparación del daño existente (Garrote *et al.*, 2003).

Estas células del sistema inmunológico tienen diversas funciones como los macrófagos y neutrófilos cuyo fin es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo como las bacterias y sustancias de desecho de los tejidos. Los mastocitos tienen una función importante en la respuesta del sistema inmunológico, fagocitar a ciertas bacterias y parásitos; además, ayudan a controlar otros tipos de respuestas inmunológicas (Chung *et al.*, 2006; Sánchez-Ramón *et al.*, 2011; Rubio-Perez *et al.*, 2012).

### 2.1.3. Enfermedades relacionadas con estrés oxidante e inflamación

En diversas enfermedades crónicas como las cardiovasculares, diabetes mellitus, la obesidad, el cáncer y la artritis, se ha demostrado una relación directa entre el aumento

de estrés oxidante y la inflamación. En todas las fases de la aterosclerosis se ha demostrado la inflamación, desde el comienzo del proceso aterogénico, pasando por fases intermedias y hasta las etapas finales (donde la placa se rompe y causa el evento coronario), la inflamación tiene una función vital, que puede desarrollar eventos coronarios agudos (Fernández-Arquero y Alonso-Orgaz, 2007). Durante la diabetes mellitus, los niveles altos de glucosa (>120 mg/dL) causan la alteración de la función de las proteínas, que junto con la autoxidación de los azúcares generan ERO que modifican la función y estructura de las células, favoreciendo el establecimiento de estrés oxidante y un estado inflamatorio crónico (Elejalde-Guerra, 2001; Sánchez-Valle *et al.*, 2013).

También la obesidad es una enfermedad que es considerada con un estado de inflamación crónico, que se acompaña de un incremento en la producción de ERO y, en consecuencia, del desarrollo de un estado de estrés oxidante sistémico, que se debe a alteraciones metabólicas en las mitocondrias, provocando un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre otras, generando un estado repetitivo de oxidación (Gutiérrez *et al.*, 2015; Herrera-Covarrubias *et al.*, 2015).

Las enfermedades englobadas dentro del término cáncer, se sabe que están estrechamente implicadas con procesos de estrés oxidante y por consecuencia, algunos de ellos en procesos inflamatorios, tal es el caso de desarrollos tumorales, donde se sabe que se atacan los tejidos y destruyen las sustancias protectoras de éstos. Además, se sabe que las ERN forman proteínas carcinogénicas como las nitrosaminas y que hay una relación estrecha entre los procesos cancerosos con un déficit de enzimas antioxidantes, características de la transformación celular. Un desequilibrio o descontrol del estrés oxidante y nitrosativo, se ha relacionado con un aumento en la formación de tumores y células cancerosas en diversas enfermedades como carcinomas de pulmón, estómago, ovario, próstata y mama con respecto a tejido sano (Elejalde-Guerra, 2001; Sánchez-Valle *et al.*, 2013; Rodríguez Graña *et al.*, 2015).

Entre las enfermedades más relacionadas con la inflamación está la artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones, produciendo una destrucción progresiva con deformidad. El efecto patológico de las especies reactivas de oxígeno en artritis reumatoide ha sido bien documentado (Matveicov *et al.*, 1994), de tal manera que se ha demostrado que un aumento en la ingesta de antioxidantes en pacientes que padecen dolores artríticos, la inflamación disminuye, así como la degeneración de la articulación y el cartílago dañado.

#### **2.1.4. Ensayos *in vitro* para determinar actividad antioxidante y antiinflamatoria**

El poder reductor de un compuesto y la capacidad de capturar radicales libres de otra sustancia, sirven como indicadores significativos de la actividad antioxidante y ésta puede ser determinada en ensayos *in vitro* con diferentes métodos, los que difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. La mayoría de dichos métodos no emplean especies radicales de significado biológico como los radicales DPPH• o el ABTS•+, que son de los más utilizados debido a la facilidad de uso y accesibilidad. Éstos son radicales ajenos al organismo, pero hay antioxidantes que pueden inhibir la oxidación lipídica a través de la quelación de metales de transición que intervienen en la producción de radicales libres (Yildirim *et al.*, 2001).

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, solo puede disolverse en medio orgánico y mide compuestos de mayor polaridad. La actividad del DPPH se atribuye a la deslocalización de un electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución metanólica. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la

pérdida de la absorbancia que presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kuskoski *et al.*, 2005; Guija-Poma *et al.*, 2015).

El ABTS (2,2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolín-6-ácido sulfónico) tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, etc.), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica para formar el catión radical ABTS. Los antioxidantes pueden neutralizar estos cationes radicales mediante la transferencia de electrones u átomos de hidrogeno. Esto hace que el catión radical (cromóforo) vaya perdiendo coloración y por lo tanto la disminución de la absorción espectrofotométrica. El porcentaje de inhibición de la formación catión radical ABTS por la muestra antioxidante añadido en un punto de tiempo fijo se cuantifica como el resultado (Cao *et al.*, 1998; Shahidi *et al.*, 2015). Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. El radical ABTS<sup>•+</sup> tiene, además de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Kuskoski *et al.*, 2005).

Los estudios de la actividad antiinflamatoria se realizan en ratas vivas estandarizadas a un peso determinado y características similares. En éstas, se prueban los extractos o compuestos con potencial antiinflamatorio en diversas concentraciones, para determinar la magnitud del efecto. Se utiliza el método de edema plantar inducido por carragenina. Para este análisis se recomiendan tres grupos, un grupo control tratado con medicamento de uso comercial, el segundo tratado con los extractos a analizar y el tercer grupo control sin tratamiento. La inflamación se registra midiendo en intervalos regulares el proceso antiinflamatorio, determinando la magnitud de la inflamación comparada con los grupos control y con la aplicación de un antiinflamatorio comercial (Adeyemi *et al.*, 2002).

La respuesta inflamatoria generada por la utilización de carragenina funciona a través de la vía Bcl10, NF-κB-IκBα para activar los mediadores de inflamación. Inicialmente, esta vía implica pasos de fosforilación seguidos de translocación nuclear de fosfo-NF-κB, lo que desencadena la transcripción y traducción de biomarcadores inflamatorios

como COX, NO, IL-6, entre otros. La inflamación causa muchos efectos, uno de ellos es la vasodilatación de los capilares y vasos sanguíneos. Debajo de la superficie de la piel (subcutánea) donde se aplica la carragenina, la inflamación provoca la dilatación de los capilares, con un aumento del flujo de sangre en esta área, manifestándose como hinchazón y enrojecimiento del área afectada (Necas y Bartosikova, 2013).

Existen diversos mediadores involucrados en la inflamación como la histamina, la serotonina, la bradiquinina y las prostaglandinas, y otro mediador importante en la inflamación aguda es el óxido nítrico (NO). Tras el aumento de la permeabilidad vascular, hay infiltración celular, principalmente neutrófilos, que contribuye a la respuesta inflamatoria al producir, entre otros mediadores, radicales libres derivados del oxígeno, como el anión superóxido y los radicales hidroxilos (Posadas *et al.*, 2004) por lo cual es ampliamente utilizado para probar la efectividad de diversos antiinflamatorios como no esteroideos (AINES) y la eficacia de los compuestos analgésicos putativos para revertir la hipersensibilidad cutánea (Fehrenbacher *et al.*, 2012)

## **2.2. ARTRITIS REUMATOIDE**

La artritis reumatoide (AR) es una poliartritis inflamatoria de origen desconocido que suele afectar a las articulaciones periféricas, con una mayor frecuencia en mujeres que en hombres (3:1). Es una enfermedad que afecta la capacidad funcional y de trabajo e incrementa la mortalidad (Neira y Ortega, 2006). En ésta, se presenta una proliferación de la membrana sinovial que cubre la superficie articular que daña cartílago, hueso y cápsula articular (Figura 2).

Diversos estudios sugieren que la AR es impulsada por linfocitos T, que se acumulan en las articulaciones, seguida por un mayor número de macrófagos y fibroblastos que liberan citocinas, particularmente IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Se cree que esta liberación de citocinas y su posterior migración son responsables de la inflamación crónica y los cambios característicos en la AR (Grover *et al.*, 2011). El TNF- $\alpha$  parece ejercer una

función central en la patogénesis de esta enfermedad, junto con la remodelación tisular inducida por las metaloproteinasas de matriz (MMP), la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la sobreproducción de NO (Imaizumi *et al.*, 2008).

Diversas investigaciones indican que el estrés oxidante en la patogénesis de la AR, tanto ERO como ERN, dañan el cartílago. La lesión tisular en la inflamación produce NO, producido por condrocitos articulares y fibroblastos sinoviales, así como niveles elevados de NO (Vasanthi *et al.*, 2009). Los radicales libres, particularmente NO y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, inhiben la síntesis de componentes de la matriz como los proteoglicanos, producidos por los condrocitos y también dañan la matriz extracelular a través de la activación y la regulación ascendente de las metaloproteinasas de la matriz (Hitchon *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Proceso inflamatorio en artritis reumatoide (Modificado de Mateen *et al.*, 2016).

En pacientes con AR, se han encontrado elevados los niveles del malonaldehído (MDA), el NO•, proteínas carboniladas, ácido hialurónico oxidado y oxidados de lípidos baja densidad (LDL). Éstos LDL oxidados pueden ser ingeridas en grandes cantidades por los monocitos, lo que da como resultado la formación de células de flotantes que están presentes en las paredes ateroscleróticas de vasos y que también se han encontrado en el líquido sinovial de la AR (Dai *et al.*, 2000).

### **2.2.1. Relación entre estrés oxidante, inflamación y artritis reumatoide**

Un aumento de las ERO y de otras especies oxidantes, lleva a un desbalance en la homeostasis del poder reductor (redox) y en consecuencia produce estrés oxidante, que altera la relación estructura-función de los diferentes niveles de organización biológica, la regulación génica y la modificación en la señalización celular, mecanismos moleculares básicos a considerar en la fisiopatología de AR (Wruck *et al.*, 2011). Este desbalance lleva a la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), característica del proceso inflamatorio que acompaña a la AR. Las especies reactivas que no logran ser neutralizadas por las defensas antioxidantes, reaccionan con proteínas, ADN, ARN y lípidos de membranas celulares determinando bloqueos en pasos del metabolismo celular y disfunción mitocondrial, que conducen al fracaso energético celular (Fink, 2001).

Con el proceso inflamatorio también ocurre un aumento en la producción de NO por inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), que al reaccionar con el anión superóxido forma peroxinitrito, una especie altamente reactiva capaz de oxidar y nitrar componentes celulares y tisulares, tales como los residuos de tirosina de las proteínas celulares y plasmáticas, el ADN y lípidos o enzimas críticas del metabolismo intermediario. Debido a la oxidación y nitración de los componentes mitocondriales, ocurre un daño estructural y funcional irreversible a nivel mitocondrial. El peroxinitrito también oxida y produce depleción de antioxidantes endógenos tales como el ascorbato, glutatión y superóxido dismutasa. En esta situación, predomina la formación de estas especies reactivas derivadas del nitrógeno sobre los mecanismos

detoxificadores intracelulares y plasmáticos, llevando al consiguiente daño celular y tisular (Paterson *et al.*, 2003).

Tanto las ERO y ERN actúan perdurando el proceso inflamatorio por diferentes mecanismos, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos. Además, las moléculas mediadoras de estrés oxidante se constituyen también en mensajeros intracelulares para la transducción de señales del proceso inflamatorio. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B activado por estos mensajeros secundarios, migra al núcleo donde selectivamente estimula la transcripción de proteínas específicas de la inflamación, además este factor induce la transcripción de genes que promueven la producción de citocinas como la IL-6, IL-8 y moléculas de adhesión (ICAM-1) que agudizan el proceso inflamatorio (Paterson *et al.*, 2003).

Con el conocimiento de los mecanismos que cursan con la inflamación y en particular con la AR, como el desbalance redox y la generación de ERO y ERN, se pueden proponer tratamientos con moléculas con actividad antioxidante y/o antiinflamatoria, que mejoren la calidad de vida de los pacientes con AR.

### **2.2.2. Tratamiento de la artritis reumatoide**

El entendimiento de cómo el proceso inflamatorio es activado y cuáles son los elementos claves en la AR, ha llevado a desarrollar estrategias para bloquear o reducir la respuesta inflamatoria. Entre las terapias antiinflamatorias, los fármacos no esteroideos (AINES) y esteroideos (AIES) son de los terapéuticos más prescritos, principalmente para el tratamiento del dolor y la inflamación. Sin embargo, el uso clínico a largo plazo de éstos se asocia con efectos secundarios significativos (Garrote y Bonet, 2003; Neira y Ortega, 2006).

Los AINES disminuyen la inflamación y el dolor, a través de la inhibición de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y el bloqueo de la liberación de diversos mediadores proinflamatorios (Chen *et al.*, 2007), pero éstos no reducen los síntomas durante el

desarrollo de la enfermedad (Domínguez *et al.*, 2012). También se emplean glucocorticoides como la dexametasona, los cuales reducen de manera muy eficaz la inflamación y generan efectos analgésicos, pero su uso está reducido a bajas dosis y tiempos cortos de uso debido a que genera efectos secundarios, como favorecer infecciones, daños cardiovasculares, neoplasias, entre otros más (Neeck *et al.*, 2002; Malysheva *et al.*, 2008) (Cuadro 1).

Otra alternativa altamente utilizada para el tratamiento de la AR son los fármacos modificadores de la enfermedad (FARMES), éstos se han estudiado ampliamente donde se ha demostrado que generan efectos deseables sobre la activación, proliferación y viabilidad de células inmunológicas, de los que se ha demostrado que muestran un efecto inhibitorio sobre la respuesta inmunológica adaptativa y el bloqueo de la activación intracelular de linfocitos T (Domínguez *et al.*, 2012) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Tratamientos reconocidos para artritis reumatoide (Vane y Botting, 1996; Domínguez *et al.*, 2012).

Tratamiento	Mecanismo de acción	Ejemplos	Efectos adversos
<b>Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)</b>	Inhibición a de la PGE, PGL COX-1 y COX-2 Efecto antiinflamatorio y analgésico	Naproxeno Paracetamol Prednisona Ibuprofeno	Ulceración gástrica, aumento de viscosidad en sangre y alteraciones de la función renal
<b>Anti-reumáticos Modificadores de la Enfermedad (FARMES)</b>	Inhiben citocinas proinflamatorias Disminuyen la interacción entre células T contra células presentadoras de antígeno Antiinflamatorio	Sulfazalicina Lefluonamida Hidroxicloroquina Metotrexato	Supresión de sistema inmunológico, cáncer
<b>Agentes Biológicos</b>	Inhiben citocinas y reguladores proinflamatorios (TNF, IL-1, IL-6, etc)	Infliximab, Tocilizumab	Inflamación generalizada, dificultad para respirar, sangrado
<b>Antiinflamatorios esteroideos (corticosteroides)</b>	Reducen la fosfolipasa A2 y, por lo tanto, reducir la liberación de ácido araquidónico. Efecto antiinflamatorio y analgésico	Dexametasona Cortisona Hidrocortisona	Daño gástrico, osteoartritis, glaucoma, cataratas, diabetes, cambios hormonales

Entre otros tratamientos poco comunes, se ha utilizado la acupuntura que se basa en la estimulación de la piel para liberar neurotransmisores, que podrían inhibir el dolor, (David *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008), o la aplicación de veneno de abeja para la estimulación de la piel, donde se implican los componentes del veneno para reducir los síntomas de la AR, estudios sugieren que controlan el dolor y formación de radicales libres (Domínguez *et al.*, 2012) (Cuadro 1). Se ha demostrado que un aumento en la ingesta de antioxidantes en pacientes que padecen dolores artríticos, la inflamación disminuye, así como la degeneración de la articulación y el cartílago dañado. Así mismo, el consumo de antioxidantes, especialmente vitamínicos, reduce el riesgo de pérdida de cartílago y el riesgo de progresión de la osteoartritis (Cerhan *et al.* 2003; Alhambra-Expósito *et al.*, 2013).

Aunque no hay una cura definitiva para la AR, los métodos actuales de tratamiento se centran en aliviar el dolor, reducir la inflamación, detener o retrasar daños en las articulaciones, mejorar las funciones y el bienestar del paciente. La administración de ácidos grasos omegas y de oligoelementos como el  $\beta$ -caroteno, vitamina E, vitamina C, selenio, zinc, en pacientes con AR, disminuyen la inflamación y los síntomas de esta enfermedad (Guerra, 1997). El consumo de alimentos o productos de éstos con propiedad antioxidante, lleva al planteamiento que la ingesta de antioxidantes puede disminuir o contrarrestar los procesos antiinflamatorios que ocurren durante el desarrollo de la artritis (Guerra, 1997; Cerhan *et al.*, 2003; Alhambra-Expósito *et al.*, 2013). Se sabe que la utilización de suplementos alimenticios como vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados tipo omega-3 tienen un efecto antiinflamatorio, a los que les atribuye la expresión de moléculas como las resolvinas y protectinas, que inhiben la activación de NF-kB y la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Domínguez *et al.*, 2012).

### **2.2.3. Ensayos *in vitro* para determinar actividad antiartrítica**

Los modelos animales de artritis se han utilizado para proporcionar información sobre el proceso de esta enfermedad, para identificar nuevos tratamientos e identificar posibles nuevos agentes terapéuticos. Estos modelos animales comparten

características con la artritis reumatoide humana, pero también tienen diferencias. Es importante seleccionar un modelo animal que tenga una patología y/o patogénesis similar a la artritis reumatoide humana y que tenga la capacidad de predecir la eficacia de un agente terapéutico dado en humanos. Además, es deseable tener un modelo que sea reproducible en mecanismo y resultado. Siempre que sea posible, el objetivo debe validarse en el modelo animal y la enfermedad humana (Hegen *et al.*, 2007). Tal es el caso de los modelos más utilizados (artritis inducida por adyuvante incompleto de Freund (AIF) y la artritis inducida por colágeno de pollo tipo II (CIA) en ratas, tal que desencadena una respuesta inflamatoria de patología similar (Ellis, 1992; García-Gonzales *et al.*, 2009).

La poliartritis severa producida por el CIA se induce en ratas mediante inyecciones intradérmicas o subcutáneas de colágeno homólogo o heterólogo tipo II, emulsionado en IFA. Se caracteriza por la destrucción marcada del cartílago asociada con la deposición del complejo inmune en las superficies articulares, la resorción ósea y la proliferación perióstica, junto con sinovitis e inflamación periarticular. La respuesta inmune robusta involucra células T y células B específicas de colágeno tipo II; estos últimos producen anticuerpos contra el colágeno tipo II. La rata CIA tiene muchas similitudes con la AR humana. Como en la AR humana, las hembras son más susceptibles. El inicio de la artritis es rápido, por lo general se desarrolla entre 10 y 13 días después de la inmunización, alcanzando su punto máximo aproximadamente el día 20 y luego disminuye gradualmente. La CIA de ratas difiere de la AR humana en que es autolimitada y no se caracteriza por exacerbaciones y remisiones. Además, el infiltrado de células inflamatorias en la CIA de ratas consiste predominantemente en células polimorfonucleares, mientras que se observa una alta proporción de células mononucleares en la AR humana (Hegen *et al.*, 2007).

Estos modelos han sido ampliamente utilizados para probar compuestos con efecto antiartrítico, como en el caso clínico aprobado para su uso de Infliximad®, con modo de acción anti-TNF (Maini y Feldman, 2002) y con efecto antiinflamatorio; de igual manera

el Rituximad® ha sido aprobado en caso clínicos con modo de acción anti-CD20, probado en agotamiento de células B en primates no humanos (Looney, 2002).

## **2.3. ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS DE ORIGEN VEGETAL**

### **2.3.1. Antioxidantes**

Con el fin de contrarrestar el efecto del exceso de los radicales libres, se ha demostrado que los antioxidantes naturales muestran un efecto positivo importante en la salud humana, ya que previenen el daño oxidante de lípidos de membranas y de importantes moléculas biológicas como el ADN (Lee *et al.*, 2013; Berradre *et al.*, 2014; Griffiths *et al.*, 2016).

Debido a que el uso de antioxidantes sintéticos puede generar efectos tóxicos secundarios, es necesario la búsqueda de compuestos naturales antioxidantes y captadores de radicales, principalmente los derivados de plantas (Yadegarinia, 2006; Berradre *et al.*, 2014). En la industria alimentaria se utilizan antioxidantes como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ), galato de propilo, tocoferoles y lecitina. El BHA y BHT son los más utilizados, sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por el empleo de antioxidantes naturales dada su efectividad, seguridad y economía (Berradre *et al.*, 2014). La ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, ya que la dieta aumenta la defensa antioxidante del organismo evitando el daño oxidante (Lee *et al.*, 2013; Griffiths *et al.*, 2016).

La actividad antioxidante de semillas y/o pericarpios de algunas frutas comestibles también ha sido demostrada, como en las de *Theobroma cacao* (cacao), *Campsiandra comosa* Benth (chiga), *Sorghum bicolor* (sorgo) y *Melicoccus bijugatus* (mamón). Esta propiedad está relacionada con el contenido de polifenoles, ya que el poder reductor del cacao resultó ser el más alto, con un equivalente al poder reductor de 5.8 g de

ácido ascórbico/100g, seguido por la chiga; las semillas de estas dos plantas presentaron una alta actividad antioxidante (Padilla *et al.*, 2008). La semilla de chíca (*Salvia hispánica*), es otra fuente rica en compuestos antioxidantes (principalmente flavonoides) (Di Sapio *et al.*, 2008).

### 2.3.2. Antiinflamatorios

En los últimos años, la eficacia de plantas medicinales y sus extractos ha sido probada en enfermedades que desarrollan estrés oxidante e inflamación. Los aceites esenciales de plantas han sido estudiados por sus capacidades antioxidantes con un alto potencial antiinflamatorio, atribuidos a la presencia de terpenos, además de los compuestos fenólicos que contribuyen a la actividad de eliminación de radicales libres y desinflamación. Los terpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de plantas medicinales, que son considerados antioxidantes naturales, algunos con propiedades antiinflamatorias (Torres-Martínez *et al.*, 2017).

El aceite esencial de albahaca, canela, clavo de olor, nuez moscada, orégano y tomillo posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias debido a sus terpenos principales. El timol y carvacrol son responsables de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Thymus spathulifolius* y *Origanum vulgare* ssp. Hirtum; los componentes principales del aceite esencial de *Melissa officinalis* son neral, geranial, citronelal, isomentona y mentona, que tienen actividad de eliminación de radicales libres. Además, la isomentona y la mentona, también son los terpenos de mayor capacidad antioxidante del aceite esencial de *Mentha longifolia* y *Mentha piperita* (Torres-Martínez *et al.*, 2018); sin embargo, los frutos de fresas silvestre (*Fragaria vesca*) poseen propiedades antioxidantes debido mayormente al alto contenido en polifenoles y a que contienen hialuronidasa, relacionada con procesos antiinflamatorios (Pernía *et al.*, 2004). De igual manera, las semillas de *Lupinus mutabilis* (Tarwi, Chocho) han mostrado un efecto antiinflamatorio debido a los alcaloides que posee, como esparteoma, angustifolina, luponina, entre otros (Castañeda *et al.*, 2002) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Ejemplos de plantas fuente de compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria.

PLANTA	COMPUESTO	EFEECTO	MODELO	MOLÉCULAS IMPLICADAS	REFERENCIA
<b>TOMATE</b> ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Licopeno β-caroteno α-caroteno Luteína	Antioxidante y Antiinflamatorio	Linfocitos de sangre periférica.	Reducción de daño del ADN por peróxido de hidrógeno	Pool-Zobel <i>et al.</i> , 1997
<b>FRUTO DE 5 SABORES</b> ( <i>Schisandra chinensis</i> )	Esquisandrín	Antioxidante y Antiinflamatorio	Edema de pata inducido por carragenina en ratonas	Reducción de NO, COX-2, PGE2, NF-kB, MAPK	Guo <i>et al.</i> , 2008
<b>AGUACATE</b> ( <i>Persea americana</i> )	Ac. grasos Carotenoides	Antioxidante y Antiinflamatorio	Célula mononuclear de sangre periférica	Reducción de IL-6 y NF-kB	Li <i>et al.</i> , 2013
<b>ACEITE DE AGUACATE</b> ( <i>P. americana</i> )	Ac. Linoleico Ac. Linolénico Ac. Oleico β-sitosterol β-caroteno	Antioxidante y Antiinflamatorio	Células durante proceso de cicatrización	Reducción de IL-6, IL8, NF-kB, NO, COX-2, TNF-α, IL-1β	Lin <i>et al.</i> , 2017

### 2.3.3. Antiartríticos

Se sabe de más de 400 especies de plantas de aproximadamente unas 100 familias con posible efecto antiartrítico, de las cuales, sobresalen especies de las familias Ranunculaceae, Araliaceae, Euphorbiaceae y Lauraceae, ya que éstas son de las más estudiadas y los resultados sugieren su uso, ya que algunos de sus extractos o compuestos muestran tanto actividad antiinflamatoria como antiartrítica. Tal es el caso de los polifenoles de la canela de la India (*Cinnamomum zeylanicum*, familia Lauraceae), que genera inhibición de la emigración de leucocitos y prostaglandinas a dosis de 8 mg/kg (Vetal *et al.*, 2013); de una fracción hexánica rica en flavanoles de *Rhus verniciflua* (familia Anacardiaceae) que presenta efectos supresores en citocinas inflamatorias y quimiocinas, así como el factor angiogénico en AR estimulado con IL-1β en dosis de 50 mg/kg (Lee *et al.*, 2009); también, extractos etanólicos (75%) de la raíz de *Aconitum vilmorinianum* (familia Ranunculaceae) reduce la hinchazón,

hiperemia y permeabilidad vascular e inhibición de COX-1 y COX-2 en dosis de 10-100 mg/kg (Li *et al.*, 2013); así mismo las saponinas del ginseng rojo (*Panax ginseng*, familia Araliaceae) que suprimen la inducción de TPA y los niveles inflamatorios en dosis de 10 mg/kg (Kim *et al.*, 2010).

En particular, es de gran importancia la búsqueda de agentes antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas como la artritis, ya que es necesario implementar dietas efectivas con alimentos, que sean utilizadas como tratamientos preventivos y curativos, realizando estudios con rigor científico, para llegar a proponer alimentos funcionales o nutraceuticos más accesibles.

Los extractos de semilla de aguacate (*P. americana*) han sido determinados con un óptimo efecto antiinflamatorio y antioxidante, por lo cual supone con posibilidad de mejorar los síntomas característicos de la artritis al disminuir la inflamación y daño por estrés oxidativo (Adeyemi *et al.*, 2002).

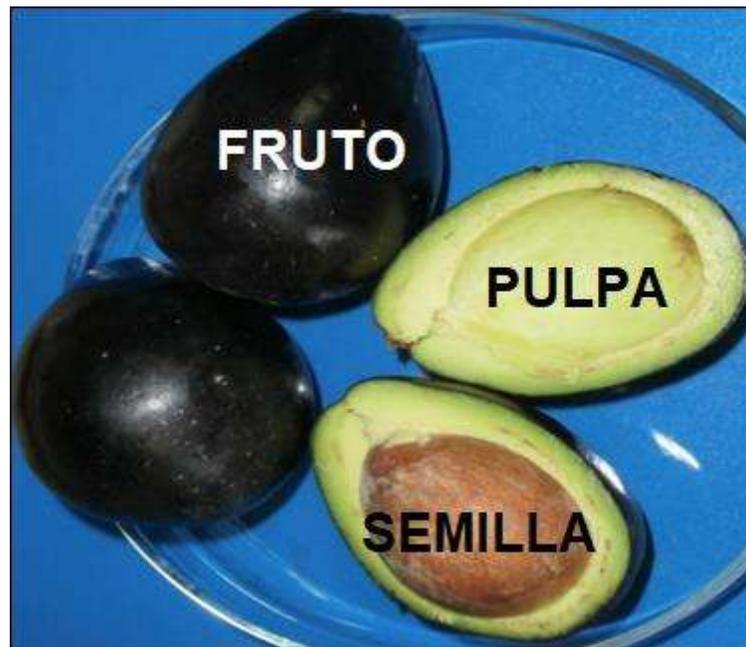
#### **2.4. AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*)**

El aguacatero (*Persea americana* Mill.) es un árbol de la familia Lauraceae, frondoso y de hoja perenne, con una floración muy generosa dando un porcentaje de fruto muy alto. Este árbol produce frutos denominados aguacate, ahuate, ahucati o palta, que se caracterizan por presentar una cáscara (pericarpio) rugosa y gruesa en su variedad comercial (*P. americana* Cv. Hass), aunque los frutos de otras variedades o híbridos, presentan diferentes tipos, formas y color del pericarpio. Los frutos de la variedad mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) o aguacate nativo mexicano, presentan el pericarpio liso y suave, de color violeta oscuro, con una semilla grande en proporción al mesocarpio o pulpa (Pérez *et al.*, 2015).

En general, los frutos de aguacate contienen 12 de las 13 vitaminas existentes, con un alto contenido de vitamina E, por lo que muestra propiedades cicatrizantes, indicada

para las heridas, psoriasis, diverticulitis, entre otros; vitamina K; y todas las vitaminas del complejo B como la B2 (riboflavina) que tiene la capacidad de actuar en la regeneración de los tejidos; además contiene minerales como potasio, magnesio, hierro, zinc y calcio; una importante concentración de ácido fólico; y un alto contenido de ácido oleico y linoleico (Bedón, 2013). Debido a que el aceite de frutos de aguacate del cultivar Hass muestra diversas propiedades, como antioxidantes y antiinflamatorias entre otras, el aceite de los frutos de la variedad nativa mexicana, debe ser analizado para determinar dichas propiedades.

El aguacate nativo mexicano se originó, cultivó y se distribuye mayormente en el centro y sur de México (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia* 'Schltdl. & Cham.' S.F. Blake), es un árbol perennifolio que llega a alcanzar hasta 30 m de altura, se caracteriza por producir frutos (bayas) relativamente pequeños (5-10 cm de longitud) de forma ovoide, globular o elíptica alargada, generalmente con un pericarpio muy delgado y suave de color violeta oscuro brillante, con una mayor proporción de semillas (2/3) que mesocarpio (Figura 3).



**Figura 3.** Frutos característicos de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*).

La semilla, entre otras partes de la planta, se utiliza en la medicina tradicional, por lo cual diversas investigaciones se han realizado cubriendo aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos (Bello-González *et al.*, 2015).

#### **2.4.1. Antecedentes directos**

Tanto la pulpa como el aceite de frutos de aguacate tienen diversas propiedades biológicas, que son atribuidas debido al contenido de componentes bioactivos como fenólicos, vitaminas y ácidos grasos o derivados. En semilla, Hiwot (2017), reportó una mayor concentración de ácido oleico, ácido palmítico y ácido linoleico, y en la pulpa se encuentran diversas vitaminas (como D, E, B6, B16 y C), minerales (como potasio, fósforo, calcio, entre otros) (Barbosa-Martín *et al.*, 2016) y aminoácidos esenciales (como valina, lisina, fenilalanina, isoleucina, leucina, treonina y metionina) (De Oliveira *et al.*, 2013). También se sabe que estos compuestos poseen capacidad antioxidante y antiinflamatoria como lo presentado por los ácidos grasos y carotenoides encontrados en el aceite que han demostrado reducir marcadores inflamatorios (Li *et al.*, 2013).

En específico, del aguacate nativo mexicano se han probado péptidos antimicrobianos con propiedades citotóxicas y antimicrobianas, que se han identificado como proteínas homólogas con defensinas vegetales. La defensina de aguacate PaDef ha demostrado actividad inhibitoria de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y citotóxica en células de cáncer de mama (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016). La defensina también fue probada en células de leucemia mieloide crónica con activación por la vía apoptótica, sin que afectara la membrana mitocondrial, ni el potencial transmembranal, así como la liberación de calcio intracelular. Además, esta defensina induce la expresión de TNF- $\alpha$  (Flores-Álvarez *et al.*, 2018).

También se ha probado el efecto de un extracto rico en lípidos de la semilla de aguacate nativo mexicano durante la internalización de *Staphylococcus aureus*, en células de epitelio mamario bovino, observando su función en la respuesta de

inmunidad innata, disminuyendo la internalización de la bacteria. Este efecto se correlacionó con la producción de NO y la inducción de la expresión de IL-10, mientras que la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  se redujo. Estos efectos podrían estar relacionados con la inhibición de la activación de MAPK p38 (Báez-Magaña *et al.*, 2019).

Así como los frutos y el aceite obtenido de las variedades comerciales de aguacate, han mostrado contener compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, los extractos lipídicos y péptidos antimicrobianos derivados de la semilla del aguacate nativo mexicano presentan un alto potencial para mantener estas propiedades. Sin embargo, no hay estudios que relacionen el contenido de compuestos derivados de la semilla de esta variedad, con la actividad antioxidante y antiinflamatoria, para relacionar su potencial como fuente de metabolitos antiartríticos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Con base en las evidencias de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, atribuidas a los frutos de aguacate, el aceite de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) se considera con un gran potencial para el estudio y análisis de dichas propiedades y su relación con capacidad antiartrítica.

En México, principalmente en la región aguacatera del Edo. de Michoacán, se cultiva la variedad de aguacate nativo mexicano, por lo que resulta importante evaluar las propiedades mencionadas del aceite de esta variedad, con el fin de generar conocimiento acerca de sus propiedades antioxidante y antiinflamatoria, y si éstas tienen una relación estrecha con el efecto antiartrítico.

## **4. HIPÓTESIS**

El aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) posee actividad antioxidante y antiinflamatoria, que son determinantes para desarrollar un efecto antiartrítico.

## 5. OBJETIVOS

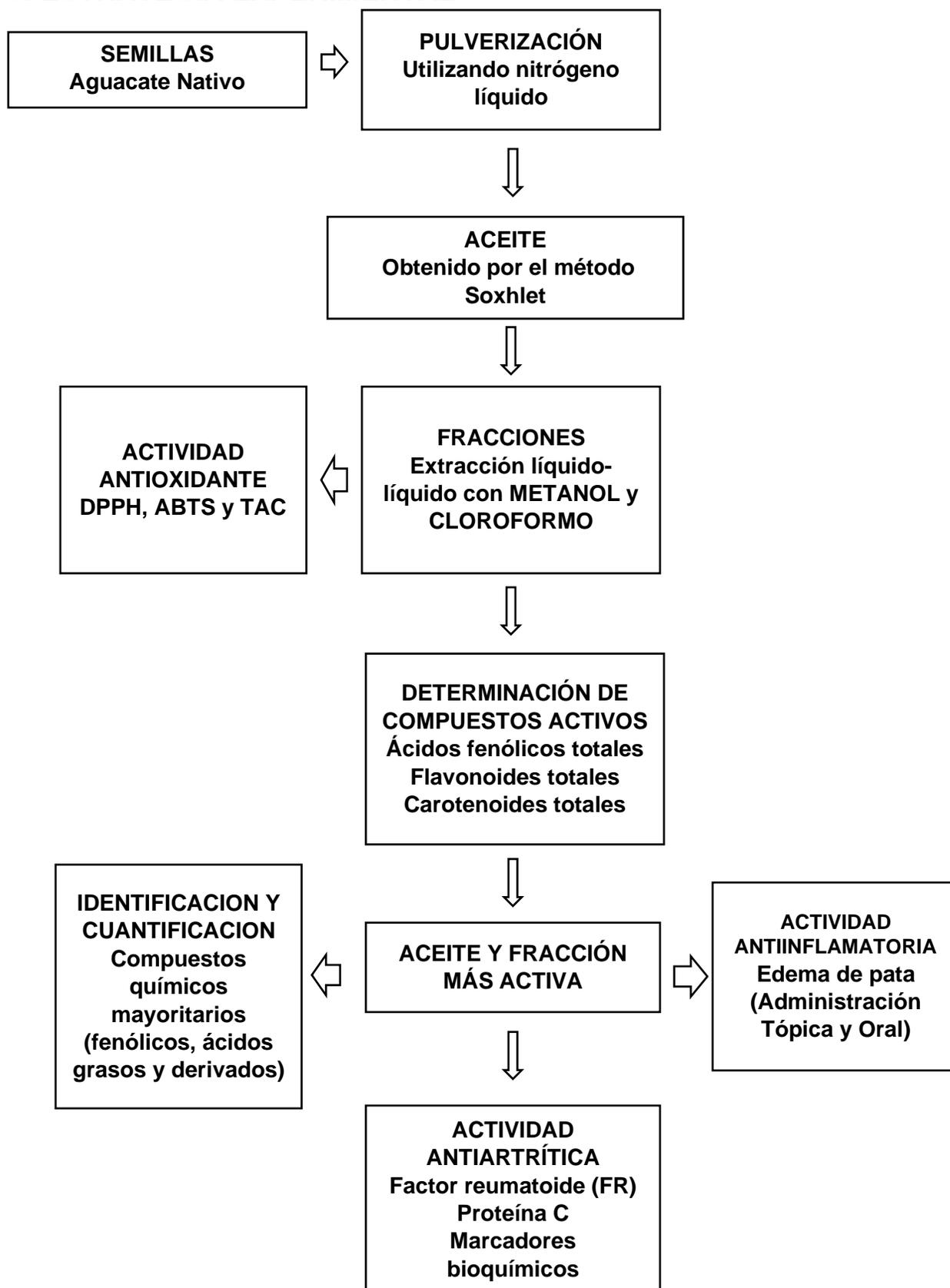
### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiartrítico del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*).

#### 5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar la actividad antioxidante del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de las fracciones metanólica y clorofórmica.
- 2) Determinar el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) y carotenoides totales en el aceite y de las dos fracciones orgánicas de la semilla de aguacate nativo mexicano.
- 3) Determinar la actividad antiinflamatoria del aceite y la fracción con mayor capacidad antioxidante en un modelo experimental de inflamación aguda.
- 4) Identificar y cuantificar los compuestos químicos mayoritarios del aceite y la fracción con mayor capacidad antioxidante y antiinflamatoria.
- 5) Analizar el efecto del aceite de semilla y la fracción más activa de aguacate nativo mexicano sobre un modelo experimental de artritis.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. RESULTADOS

### 7.1. CAPÍTULO I. Actividad antioxidante del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) y su relación con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides totales.

#### Resumen

El aceite de aguacate nativo mexicano presenta diversas propiedades, como capacidad captadora de radicales libres. Esta propiedad fue analizada *in vitro* por diversos métodos (DPPH, ABTS y TAC), utilizando tres fracciones de distinta polaridad (metanol, cloroformo y hexano) a una concentración de 1 mg/mL, a las que se les determinó el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides. Aunque con el método DPPH, la mayor actividad antioxidante fue mostrada por las fracciones clorofórmica y hexánica, con 91.4% y 90% de capacidad captadora de radicales libres, respectivamente, la fracción metanólica alcanzó un 99.7% de actividad antioxidante con el método ABTS, presentando una IC<sub>50</sub> de 0.035 mg/mL, y de 80.8% con el método TAC, registrando una IC<sub>50</sub> de 0.153 mg/mL. Las fracciones clorofórmica y hexánica mostraron porcentajes menores al 50% de actividad antioxidante. Con los valores de IC<sub>50</sub>, la fracción metanólica es considerada la de mayor actividad antioxidante. Una relación directa de la actividad antioxidante con el contenido de los compuestos bioactivos, en cada una de las fracciones, encontrando los mayores valores para ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides totales (0.17 µmoles EAG/mg p.f., 5.49 µmoles EQ/mg p.f. y 2.35 mg EL/Kg p.f., respectivamente) en la fracción metanólica de la semilla de aguacate nativo mexicano.

**Palabras clave:** ABTS, DPPH, TAC, IC<sub>50</sub>, aguacate nativo mexicano.

#### Abstract

Native Mexican avocado oil has different properties, such as free radical scavenging capacity. This property was analyzed by different *in vitro* methods (DPPH, ABTS, and TAC), using three fractions with different polarity (methanol, chloroform and hexane) at a concentration of 1 mg/mL, determining total content of phenolic acids, flavonoids and carotenoids. With the DPPH method, the high antioxidant activity was shown for chloroform fraction and avocado oil, with 91.4% and 90% of scavenging free radicals, respectively; however, the methanol fraction achieved a 99.7% of antioxidant activity with ABTS method, presenting an IC<sub>50</sub> of 0.035 mg/mL, and 80.8% with the TAC method, (IC<sub>50</sub> of 0.153 mg/mL). The chloroform fraction and avocado oil showed less than 50% of antioxidant activity. According to IC<sub>50</sub> value, the methanol fraction shown the highest antioxidant activity. A direct relationship of antioxidant activity with the content of bioactive compounds, was observed in each one of the fractions, finding the highest values for total phenolic acids, flavonoids and carotenoids (0.17 µmol EAG/mg w.f., 5.49 µmol EQ/mg w.f. and 2.35 mg EL/Kg w.f., respectively) in the methanol fraction of native Mexican avocado seed.

**Keywords:** ABTS, DPPH, TAC, IC<sub>50</sub>, native Mexican avocado.

## Introducción

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante principalmente actúa por su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena (Londoño, 2012). Los radicales libres producidos en cantidades excesivas pueden causar daño a compuestos orgánicos como proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos, además de inactivar enzimas y oxidar hormonas, que da como resultado el deterioro estructural celular y tisular, como el rompimiento de membranas y mutaciones celulares, que puede llevar hasta la muerte celular. Este daño desempeña un papel importante en la patogénesis del envejecimiento y de enfermedades crónicas degenerativas que cursan con procesos de inflamación como la diabetes, hipertensión, cáncer y artritis, entre otras (González-Torres *et al.*, 2000).

Los radicales libres son transformados a formas no reactivas por las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas endógenas de las células, aunque cuando se genera el estrés oxidante, que ocurre cuando hay un desbalance entre los radicales libres y los antioxidantes, éste puede ser regulado con antioxidantes exógenos que aportan los alimentos, como las frutas, semillas, otras partes vegetales o extractos derivados de éstos (Coronado *et al.*, 2015).

Los antioxidantes en los alimentos son importantes, ya que definen las propiedades organolépticas y ayudan a preservar su calidad nutricional, que han mostrado ser coadyuvantes en la salud al ser utilizados en la dieta. Es por esto, que es recomendable ingerir alimentos ricos en antioxidantes naturales. Aunque ciertos antioxidantes sintéticos son utilizados en la industria alimentaria, su consumo puede generar efectos tóxicos secundarios, por lo que es necesario la búsqueda de compuestos naturales antioxidantes y captadores de radicales, principalmente los encontrados en los alimentos o derivados de plantas (Yadegarinia, 2006; Berradre *et al.*, 2014). Ejemplos de este tipo de antioxidantes son el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión, urato, bilirrubina y compuestos fenólicos como los flavonoides y taninos, entre otros. La vitamina E, el  $\beta$ -caroteno y la vitamina C son los únicos nutrientes esenciales que atrapan directamente radicales libres (González-Torres *et al.*, 2000).

El aguacate, aceite de oliva, arroz integral y frutas secas, son de los productos de mayor consumo con antioxidantes, por contener vitamina E; acelgas, tomates, cítricos, kiwi, fresa, guayaba, debido a que contienen vitamina C; zanahoria, espinacas, mango, melón, entre otros, por su alto contenido de  $\beta$ -caroteno; y té verde, vino, manzana o peras, debido a los flavonoides (Coronado *et al.*, 2015). En particular, diversas semillas poseen propiedades antioxidantes debido al contenido del aceite que de éstas se extraen y de sus componentes, tal es el caso de semillas de uva (Wongnarat y Srihanam, 2017; Mirbagheri *et al.*, 2018), anonas (Benites *et al.*, 2015), cacao (Batista *et al.*, 2016), calabaza y amaranto (Valenzuela *et al.*, 2015; Peiretti *et al.*, 2017), mango (Okpala y Gibson-Umen, 2013), tamarindo, yaca y de aguacate (Soong y Barrow, 2004), entre otras más.

Los frutos y semillas de aguacate, generalmente del cultivar Hass, han sido estudiados como fuente de aceite de grado alimenticio, el cual muestra alta actividad antioxidante por su contenido de ácidos grasos insaturados, vitamina E, ácido ascórbico, vitamina B6,  $\beta$ -caroteno y compuestos fenólicos diversos, relacionados con sus propiedades medicinales con efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, hipoglucémicos, antihipertensivos y antihiperlipidémicos (Rosenblat *et al.*, 2011; Caballero *et al.*, 2014; Carvajal *et al.*, 2014; Dreher y Davenport, 2014). Los lípidos son el componente más importante de este fruto, que alcanza niveles hasta del 25%, dependiendo de la variedad y la madurez, y al cual se le atribuyen propiedades benéficas para la salud (Ozdemir y Topuz, 2003; Ding *et al.*, 2007).

Recientemente se ha evaluado su capacidad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y los principales fitoquímicos antioxidantes presentes tanto en la pulpa como en la semilla y la cáscara de diferentes variedades e híbridos de aguacate (Wang *et al.*, 2010; Restrepo *et al.*, 2012), situando al aceite de este fruto con un gran potencial de uso como ingrediente en alimentos funcionales y para fines cosméticos, que por sus cualidades puede sustituir al aceite de oliva (Requejo *et al.*, 2003).

El aceite de los frutos de la variedad mexicana de aguacate (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), que han sido utilizados en la medicina tradicional de México (Gioanetto y Blas, 2000; Bello-González, 2006), no han sido estudiado para determinar algunas de sus propiedades medicinales, por lo que en la presente investigación se determinó el efecto antioxidante del aceite de semilla de este fruto, así como su relación con los principales compuestos bioactivos, como ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

**Semillas de aguacate nativo mexicano.** Los frutos fueron colectados en los meses de mayo a agosto de 2018, en plantas cultivadas en huertos de la región de Tingambato, Michoacán, México (19°30'6" Norte, 101°51'14" Oeste). Las semillas fueron separadas de los frutos y almacenadas en congelación (-20°C) hasta su uso.

### **Obtención del aceite y las fracciones**

**Aceite de semillas.** El aceite se obtuvo por el método Soxhlet, utilizando 100 g de semilla pulverizada en nitrógeno líquido, por cada reflujo de hexano se usaron 1000 mL durante 6 h. En total se utilizó 1 kg de semilla pulverizada para la obtención del aceite.

**Fraccionamiento.** El aceite de aguacate nativo mexicano fue fraccionado por extracción líquido-líquido en la siguiente secuencia: Fracción 1 Metanólica y Fracción 2 Clorofórmica. Se utilizó un embudo de separación para la recuperación de cada una de las fracciones por separación de fases, éstas fueron evaporadas a sequedad y resuspendidas a una concentración de 100 mg/mL.

## Métodos para determinación de la actividad antioxidante

**Método DPPH.** La capacidad captadora de radicales libres se realizó de acuerdo a lo descrito por Karamać *et al.* (2005) con el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo: Medición del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Se combinó 100 µL de muestra con dos mililitros de solución DPPH a 0.5 mmol/L en metanol; se incubó por veinte minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después, se midió la absorbancia de la solución de cada muestra a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. El total de la actividad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{DPPH - Muestra}{DPPH} \times 100$$

Donde *Muestra* es la absorbancia del DPPH mezclado con las muestras y el *DPPH* es la absorbancia del DPPH. Como control positivo se utilizó el antioxidante sintético comercial BHT (1mg/mL) y Trolox (1mg/mL).

**Método ABTS.** Se determinó la actividad antioxidante de acuerdo a lo descrito por Arnao *et al.* (2001), midiendo la actividad captadora de radicales libres 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS). Se utilizó una solución de ABTS (7.4 mM) con persulfato de potasio a 2.6 mM utilizando metanol como disolvente. Se combinó 100 µL de muestra con 1900 µL de solución ABTS, incubó por siete minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después, se midió la absorbancia de la solución de cada muestra a 737 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. El total de la actividad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = 100 - \frac{Muestra \times 100}{ABTS}$$

Donde *Muestra* es la absorbancia del ABTS mezclado con las muestras y el *ABTS* es la absorbancia del ABTS. Como control positivo se utilizó antioxidante sintético comercial BHT (1mg/mL) y Trolox (1mg/mL).

**Método TAC.** La capacidad antioxidante total (TAC). se evaluó de acuerdo a lo descrito por Prieto *et al.* (1999). Donde se combinó una parte de 100 µL de muestra con 900 µL. de solución reactiva (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de potasio 28 mM, y molibdato de amonio 4 mM). Los reactivos se incubaron a 95 °C durante noventa min. Después de que los reactivos se enfriaran a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la solución de cada muestra a 695 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. El total de la actividad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{TAC (\%)} = 100 - \frac{A_{muestra} - A_{control}}{A_{blanco}} \times 100$$

Donde  $A_{muestra}$  es la absorbancia de la muestra (cada una de las fracciones) mezclada con la solución reactiva (TAC),  $A_{control}$  es la absorbancia del agua desionizada mezclado con el reactivo (TAC), y  $A_{blanco}$ , el solvente de las fracciones en lugar de la

muestra. Como control positivo se utilizó antioxidante sintético comercial BHT (1mg/mL).

**Determinación de IC<sub>50</sub>.** La concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) de la actividad antioxidante fue determinada para la fracción con mayor porcentaje de capacidad antioxidante por los métodos TAC y ABTS (anexos 11.1 y 11.2) realizando una curva de calibración en concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL.

### Determinación de compuestos bioactivos

**Contenido de ácidos fenólicos totales.** - El contenido de ácidos fenólicos totales se determinó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Schwarz, 2001), consistente en mezclar 100 µL de cada uno de los extractos con 750 µL de la solución de Folin-Ciocalteu, preparada 1:10 con agua estéril. Las mezclas se homogenizaron en un vortex durante 5 min, para después añadir 750 µL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 6% preparada con agua estéril. Posteriormente a la mezcla, se dejaron reposar por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. Los resultados se muestran en µmoles equivalentes a ácido gálico por gramo de peso fresco (µmoles EAG/mg p.f.), obtenidos por curva de calibración preparada usando concentraciones de ácido gálico como estándar entre 0 y 1 µmoles, obteniendo las lecturas a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. El contenido se calculó por la ecuación de la recta generada por la curva de linealidad realizada (anexo 11.3a):

$$X = \frac{Y + 0.0016}{6.1652}$$

**Determinación de flavonoides totales.** - Para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método de Kim et al. (2003), que consiste en mezcla 10 µL de cada uno de los extractos de semilla de aguacate con 490 µL de metanol, sometiendo la mezcla a agitación en vortex, para posteriormente agregar 1 mL de metanol, 100 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 10% y 100 µL de 1 M de acetato de potasio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K). Finalmente, las muestras se sometieron a agitación severa en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad, para obtener las lecturas de absorbancia a 415 nm. La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración realizada con quercetina, con un rango de concentración de 0 a 100 µmoles (λ=415 nm). Los valores se presentan en equivalentes de µmoles de quercetina/mg peso fresco (µmoles EQ/mg p.f.), obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad (anexo 11.3b).

$$X = \frac{Y + 0.0114}{0.016}$$

**Determinación de carotenoides.** - El contenido de carotenoides se obtuvo por el método modificado de Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (1989). Primero se preparó una solución de dimetilformamida/carbonato de magnesio (DFM/MgCo<sub>3</sub>), a 500 mL de dimetilformamida se adicionaron 0.2 g de carbonato de magnesio, disolviendo completamente en frío y almacenando a 4°C. Posteriormente se realizó

una mezcla de 0.5 mL de cada una de las muestras con 1 mL de la solución de DFM/MgCo<sub>3</sub>. Las muestras fueron llevadas a agitación vigorosa en un vortex por 5 min y se les añadió 1 mL de hexano, para después, de nuevo agitarlas, dejando en reposo unos minutos. Una vez que las fases se separaron y fueron evidentes, se retiró la fase superior con una micropipeta, para llegar a la fase ligeramente coloreada, por último, se leyó cada una de las muestras en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV a una longitud de onda de 470 nm. Los valores se presentan en miligramos equivalente de luteína/Kg peso fresco (mg EL/Kg p.f.). Para determinar el contenido de carotenoides totales por volumen de muestra, se utilizó la siguiente ecuación (Mraicha *et al.*, 2010):

$$\text{Carotenoides} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{Abs} \lambda * 10^3 * .495}{\epsilon * .005}$$

Dónde: Abs = Lectura de Absorbancia obtenida de  $\lambda$  (Longitud de onda de la luteína es 470);  $\epsilon$  = Coeficiente de extinción de luteína (2000).

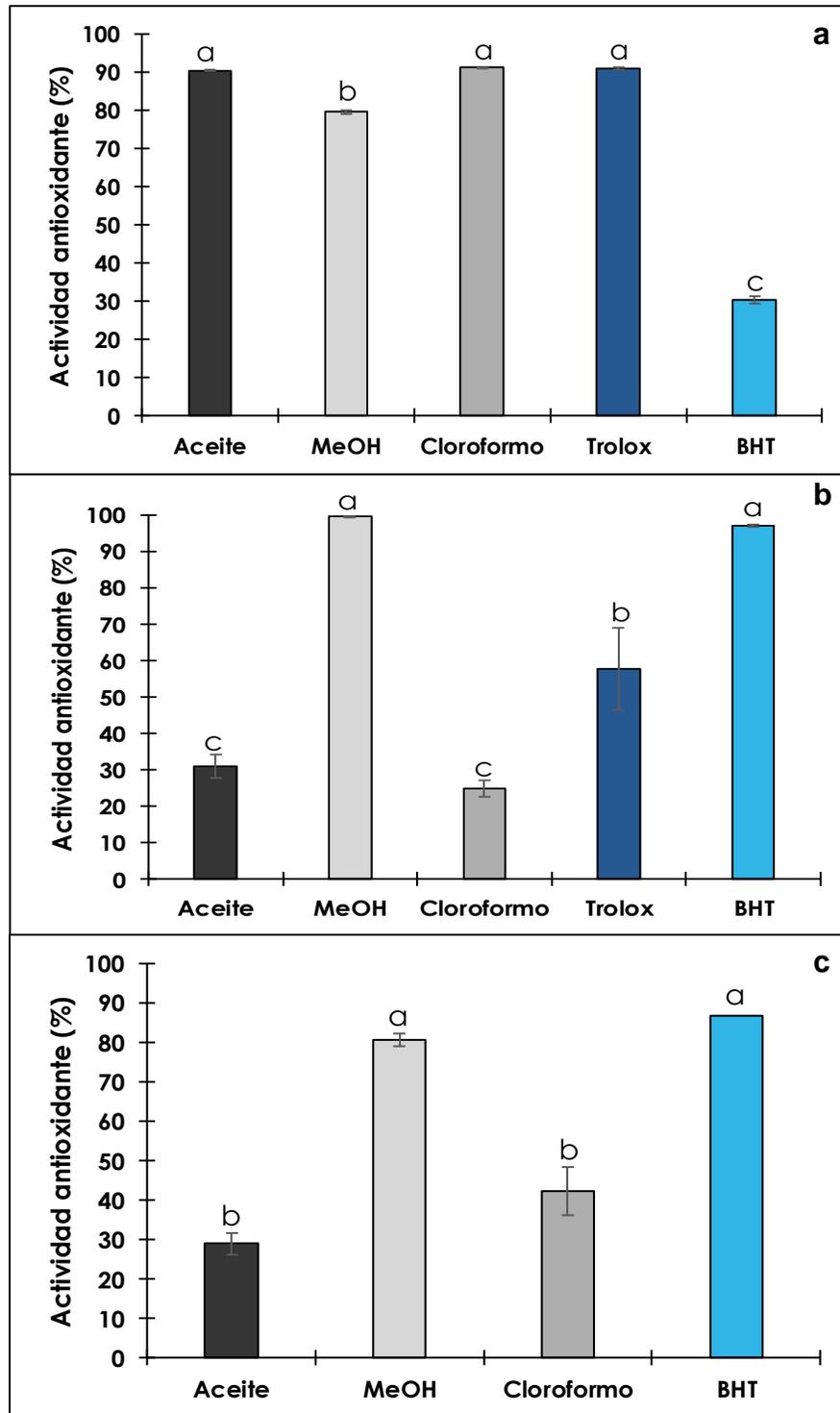
## Resultados y discusión

Los aceites extraídos de semillas de diversos frutos han demostrado tener actividad antioxidante de radicales libres en pruebas *in vitro*. Estos radicales libres incluyen principalmente las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical hidroxilo, radical peroxilo, radical superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y diversos peróxidos lipídicos. Aunque existen diferentes métodos para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de un extracto, fracciones y compuestos de origen vegetal, algunos de los cromógenos más utilizados son DPPH, ABTS y TAC, ya que son estables y las diferencias se deben a la especificidad del tipo de compuestos como su polaridad y solubilidad (Kuskoski *et al.* 2005; Moon y Shibamoto, 2009).

En la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante y compuestos bioactivos con estos tres métodos, de las fracciones obtenidas del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), extraído con hexano, éstas mostraron porcentajes de actividad antioxidante dependientes del tipo de disolvente y el método antioxidante utilizado.

### Actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y TAC

Con el método de DPPH, la actividad antioxidante de las fracciones fue alta, aunque el aceite y la fracción clorofórmica obtuvieron los porcentajes más altos (>90%), en comparación con un 79.7% mostrado por la fracción metanólica, todas con valores más altos al presentado por el antioxidante sintético (BHT) y similares a Trolox. La fracción clorofórmica, con una actividad de 91.4% fue tres veces más eficaz que el BHT, con el que se obtuvo una capacidad antioxidante del 30.4% (Figura 4a).



**Figura 4.** Porcentaje de actividad antioxidante por el método DPPH (a), ABTS (b) y TAC (c) del aceite de semilla de *P. americana* var. *drymifolia* y las fracciones metanólica (MeOH) y de cloroformo, comparadas con la del butilhidroxitolueno (BHT) y Trolox, a una concentración de 1 mg/mL. Letras distintas muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).

A partir de los resultados mostrados, se puede indicar que tanto el aceite de la semilla de aguacate nativo mexicano como las dos fracciones obtenidas de éste, tuvieron una actividad similar para capturar el radical DPPH, superior al BHT a la concentración de 1 mg/mL. El obtener valores similares de la actividad antioxidante por este método, sugiere que el aceite y las dos fracciones contienen compuestos de naturaleza polar o polar intermedia, debido a la solubilidad del DPPH, por lo que la actividad se relaciona con esta característica (Kuskoski *et al.* 2005).

En algunos extractos de plantas y fracciones de diferente polaridad se han observado resultados similares a los obtenidos en esta investigación, como en hojas de *Bocconia frutescens* (Rodríguez-Aguirre *et al.*, 2015), en tallos y hojas de *Piper daniel-gonzalezii* (Cardona-Galeano *et al.*, 2013) y en hojas de *Pistacia atlántica* (Alidadi *et al.*, 2017), en las que las fracciones con solventes de polaridad intermedia como el acetato de etilo y cloroformo, mostraron altos porcentajes de actividad antioxidante. En otros estudios, se ha encontrado que fracciones, extractos hexánicos o aceites, poseen también una alta actividad atrapadora del radical DPPH, como los de semillas de *Erythrina americana*, incluso mayor que la de extractos metanólicos (Ibarra-Estrada *et al.*, 2011).

Aşık y Özkan (2011) reportaron la mayor actividad antioxidante para el aceite de oliva con hasta un 89.6% de inhibición de radical DPPH. Algunas fracciones hexánicas pueden contener diferentes compuestos con alta capacidad antioxidante, desde ácidos fenólicos, flavonoides, flavonoles y taninos hidrolizables, que son responsables de dar dicha actividad mediante el método DPPH (Alidadi *et al.* 2017). En el aceite o extractos de aguacate, se han reportado este tipo de compuestos, como fenoles, carotenoides, ácidos grasos de cadena larga, que tienen capacidad antioxidante (Soong y Barrow, 2004, Wang *et al.*, 2010; Rosenblat *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2012), que pudieran ser los responsables de la alta actividad antioxidante DPPH con los tres disolventes de diferente polaridad, mostrada por las fracciones del extracto de semilla de aguacate nativo mexicano.

Los resultados observados de la actividad antioxidante determinada con el ensayo ABTS, fueron diferentes, ya que, la fracción metanólica fue la que mostró la mayor actividad antioxidante, con 99.7%, mayor que la observada en la fracción clorofórmica (25%) y que la del aceite (31%). En la figura 4b se observa que la actividad antioxidante registrada por la fracción metanólica fue mayor que la presentada por el BHT (97.2%) y Trolox (58%).

El valor de 99.7% de actividad antioxidante mostrado por la fracción metanólica del extracto de semilla de aguacate nativo mexicano por este método, indica que los compuestos polares separados del extracto tienen una alta capacidad de atrapar radicales; así mismo, la baja actividad observada en las fracciones clorofórmica y en el aceite, demuestran que los compuestos de polaridad intermedia y baja polaridad tienen una actividad antioxidante menor. De manera clara, estos resultados coinciden con muchos de los estudios realizados con este tipo de fracciones de diversos extractos de plantas, sobre todo, de aquellos que contienen compuestos de naturaleza fenólica (Diem *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos con el ensayo de actividad antioxidante total (TAC) fueron similares a los encontrados con el ensayo ABTS, con el que también se mostró que la fracción metanólica tuvo el mayor porcentaje de actividad (80.8%), con diferencia significativa respecto a la actividad de la fracción clorofórmica (42.4%) y el aceite (29%), similar al presentado por el BHT (87%) (Figura 4c). Con este método de capacidad antioxidante total (TAC), se han obtenidos valores similares al mostrado por la fracción metanólica del extracto de semilla de aguacate nativo mexicano (80%), como lo demuestran los extractos de *Merremia borneensis* (Amzad y Dawood, 2015), en los que los de naturaleza polar presentaron una mayor capacidad antioxidante.

El valor calculado de la IC<sub>50</sub> para la fracción con mayor capacidad antioxidante, se realizó tanto para el método ABTS como TAC, para el primero se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 0.035mg/mL y para el segundo, fue de 0.153 mg/mL. Con todos estos resultados, se demostró que la fracción metanólica fue la que mostró la mayor capacidad inhibitoria de radicales libres, lo que concuerda con otros extractos, como el de hojas de aceituna (Rafiee *et al.*, 2012) o incluso mayor a los reportados para el aceite de oliva var. Akerna y aceite de fruto de *Syagrus coronata* (Bauer *et al.*, 2013; Lainer *et al.*, 2014).

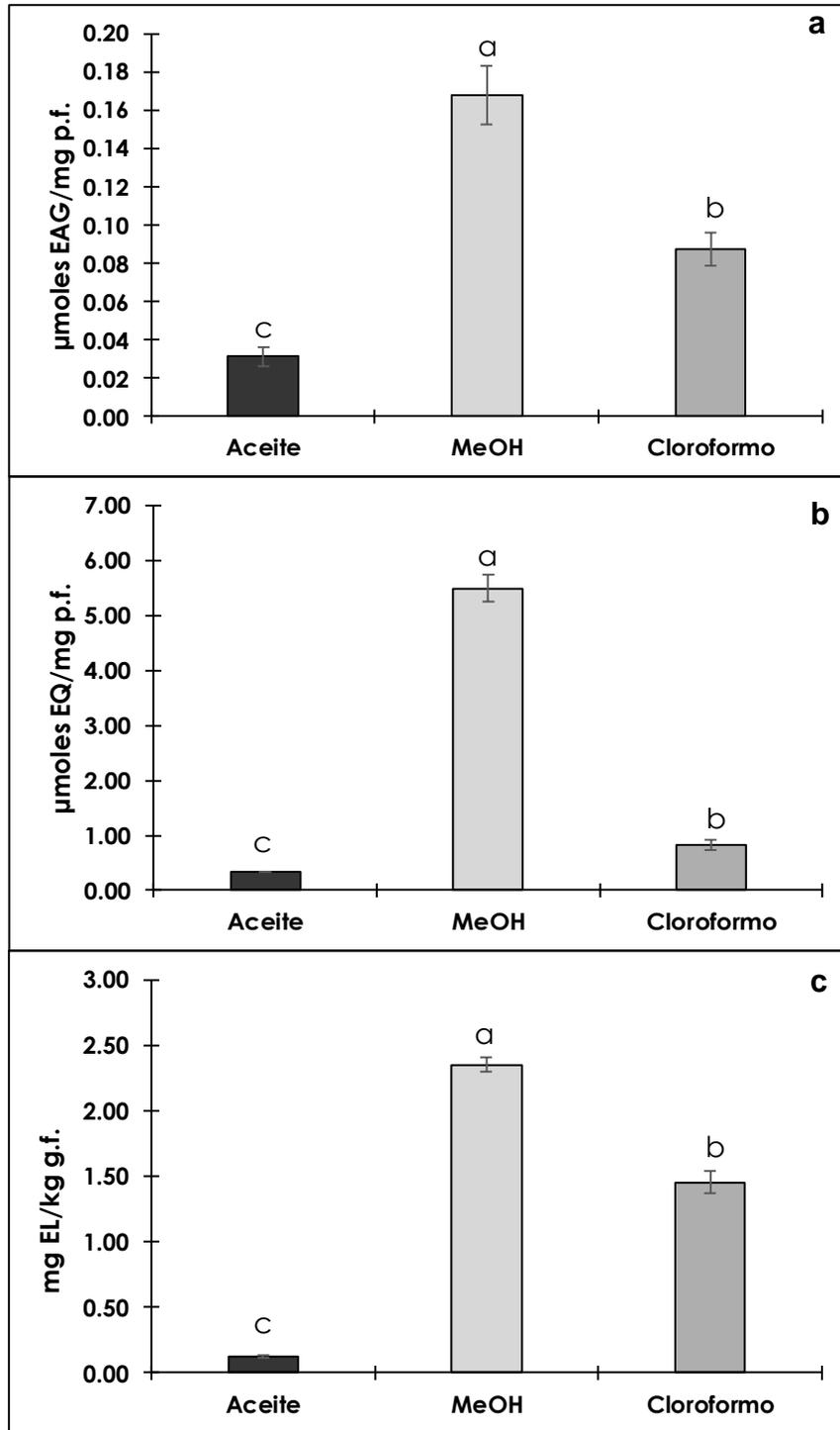
En resumen, el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano presentó una alta actividad antioxidante, ya que éste y las fracciones metanólica y clorofórmica, mostraron porcentajes mayores al 79% de actividad antioxidante según el método de DPPH, de las que la fracción metanólica, presentó el mayor porcentaje mediante la determinación por ABTS y TAC, con valores de 99.7% y 80.8%, respectivamente.

Los valores de IC<sub>50</sub> de la fracción metanólica demuestran que a concentraciones relativas bajas (0.153 mg/mL para TAC y 0.035 mg/mL para DPPH), se obtuvo la mayor capacidad captadora de radicales. En base a estos resultados, se propone el desarrollo de más estudios con esta fracción, en específico con ensayos *in vivo* de inflamación y artritis reumatoide, interés en nuestro grupo de trabajo.

## **Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides**

### **Ácidos fenólicos totales**

Con el análisis del contenido de ácidos fenólicos totales se observó que en la fracción metanólica se registró el más alto, con 0.17  $\mu$ moles EAG/mg p.f., seguida por la fracción clorofórmica con 0.087  $\mu$ moles EAG/mg p.f., siendo el menor, lo encontrado en el aceite, con 0.031  $\mu$ moles EAG/mg p.f (Figura 5a). Estos valores son más bajos que los reportados para extractos de semilla y cáscara de *P. americana* Cv. Hass (Calderon *et al.*, 2016), sin embargo, son valores más altos que los mostrados por el aceite de oliva var. Arbequina y aceite de oliva var. Chemalali Sfax (Chtourou *et al.*, 2013). Así mismo, el contenido de ácidos fenólicos de la fracción metanólica del aceite de aguacate nativo mexicano son similares a los de los extractos de semillas de girasol (*Helianthus annuus*) (Pajak *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Determinación de ácidos fenólicos totales ( $\mu$ moles equivalentes a ácido gálico/mg p.f.) (a), de flavonoides totales ( $\mu$ moles equivalentes a quercetina/mg p.f.) (b) y de carotenoides totales (miligramos equivalentes a Luteína/Kg p.f.) (c), del aceite de semilla de *P. americana* var. *drymifolia* y las fracciones metanólica (MeOH) y de cloroformo. Letras distintas muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).

## Flavonoides

Con el método de determinación de flavonoides totales se obtuvo un mayor contenido en la fracción metanólica, con 5.49  $\mu$ moles EQ/mg p.f., en comparación con la fracción clorofórmica (0.82  $\mu$ moles EQ/mg p.f.) y el aceite (0.38  $\mu$ moles EQ/mg p.f.) (Figura 5b). Estos resultados indican que tanto el aceite y las dos fracciones obtenidas de la semilla de aguacate nativo mexicano, presentaron un contenido de flavonoides totales superior a lo registrado por extractos de semilla y cáscara de *P. americana* Cv. Hass (Calderon *et al.*, 2015) y en el aceite de oliva cultivar Chelali (Ammar *et al.*, 2014), con una cantidad similar a lo reportado para el extracto clorofórmico de semillas de girasol (*Helianthus annuus*) (Pajak *et al.*, 2014).

## Carotenoides

Con la determinación del contenido de carotenoides totales se observó también, que en la fracción metanólica se registró el más alto, con 2.35 mg EL/kg p.f., seguida por la fracción clorofórmica con 1.45 mg/kg, siendo el menor, lo encontrado en el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, con 0.12 mg/kg (Figura 5c).

El contenido de carotenoides de la fracción metanólica es similar al encontrado en el aceite de oliva extra virgen de cultivar *Edremit* y *Uslu*, y mayor que lo reportado para el aceite de los cultivares *Gamlık* (Yuksel *et al.*, 2018) y *Memecik* (Aşık *et al.*, 2011). Así mismo, un menor contenido de carotenoides se ha obtenido en fracciones clorofórmica y en el aceite de oliva del cultivar *Chemali Sfax* (Chtourou *et al.* 2013). Esta cantidad obtenida en la fracción metanólica del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, es mayor que el reportado para el aceite de frutos de aguacate cultivar Hass (Sunil y Thiagarajan, 2015).

La actividad antioxidante de la fracción metanólica se relacionó directamente con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides, en la que se encontró el contenido más alto, sugiriendo que éstos pueden ser los responsables de esta propiedad.

## Conclusión

Aunque la fracción clorofórmica y el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano presentaron una alta actividad antioxidante mediante el método DPPH, la fracción metanólica mostró la mayor actividad antioxidante con los métodos ABTS y TAC, por lo que fue considerada como la de mayor capacidad captadora de radicales libre. Ésta presentó una relación directa con el mayor contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides.

## Referencias

- Alidadi, S., Taghi M.M., Asadi-Samani, M., & Lorigooini, Z.** (2017). Antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts and fractions of *Pistacia atlantica*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(4):293-297.
- Ammar, S., Zribi, A., Ben, A., Ayadi, M., Abdelhedi, R. & Bouaziz, M.** (2014). Effect of processing systems on the quality and stability of chemlali Olive Oils., *JOS - Journal of Oleo Science*, 63(4):311-323.
- Amzad M.H., & Dawood, M.S.** (2015). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1):66-71
- Arnao, M.B., Cano, A. y Acosta, M.** (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Aşık, H.U. & Özkan, G.** (2011) Physical, chemical and antioxidant properties of Olive Oil extracted from Memecik Cultivar. *Academic Food Journal*, 9(2):13-18.
- Batista, N.N., Pereira de Andrade, D., Lacerda-Ramos, C., Ribeiro-Días, D. & Freitas-Schwana R.** (2016). Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Research International*, 90(1):313-319.
- Bauer, L.C., Amaral, J.M.D., Viana de Silva, M., Andrade, D., Andrade, S., & Izabelle, J.,** (2013). Chemical characterization of pressed and refined licuri (*Syagrus coronata*) oils., *Acta Scientiarum. Technology*, 35(4):771-776.
- Bello-González, G.M.A.** (2006). Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.
- Benites, R.S.R., Formagio, A.S.N., Argandoña, E.J.S., Volobuff, C.R.F., Trevizan, L.N.F., Vieira, M.C. & Silva, M.S.** (2015). Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Braz. J. Biol.*, 75(3):685-691.
- Caballero, E., Soto, C., Olivares, A. & Altamirano, C.** (2014). Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-Type production catalyzed by commercial immobilized lipases. *PLoS ONE*, 9(9):e107749.
- Calderon-Oliver, M., Escalona-Buendía, H., Medina-Campos, O., Pedraza-Cheverri, J., Pedroza-Islas, R. & Ponce-Alquicira, E.** (2015) Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado by products., *LWT - Food Science and Technology*, 65(2016):46-52.
- Cardona-Galeano, W., Robledo-Restrepol, S.M., Rojanoll, B.A., Alzate-Guarini, F., Muñoz-Herrera, D.L. & Saez-Vega, J.** (2013). Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2):268-277.
- Carvajal, Z., Nolasco, H., Aguilar, U., Melo, S., Hayward, J. & Barradas, D.** (2014). Effect of dietary intake of avocado oil and olive oil on biochemical markers of liver function in sucrose-fed rats. *BioMed Research International*, 2014(1):1-8.
- Chtourou, M., Gargauri, B., Jaber, H., Abdelhedi, R. & Bouaziz, M.** (2013). Comparative study of olive oil quality from *Chemlali Sfax* versus *Arbequina* cultivated in Tunisia. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 115(1):631-40
- Coronado, H.M., Vega y León S., Gutiérrez L.R, Vázquez F.M. & Radilla V.C.** 2015. Antioxidants: present perspective for the human health. *Rev. Chil. Nutr.*, 42(2):206-212.
- Diem, Q.D., Elisa, A.A., Lan, P.T.N., Huong, L.H., Edi, F.S., & Ismadji, S,Y.H.J.** (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*, 22(3):296-302.

- Ding, H., Chin, Y.W., Kinghorn, A.D. & D'Ambrosio, S.M. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin Cancer Biol.*, 17(5):386-94.
- Dreher, L. & Davenport, J. (2014). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7):738–750.
- Gioanetto, F. y Blas, M. (2000). Etnobotánica de la meseta P'urepecha, CRIC, Roma.
- González-Torres, M.C., Betancourt-Rule, M. & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1):3-9.
- Ibarra, E.E., Pacheco, M.S, García, R.M., San Miguel R.C., Ramirez, G.V. & Soto M.H. (2011). Antioxidant activity of *Erythrina americana* Miller Alkaloids. *Rev. Fitotec. Mex.*, 34(4):241-246.
- Karamać, M., Kosińska, A. & Pegg, B.R. (2005). Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2):165-70.
- Kim, D.O., Jeang, S.W. & Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81(3):321-26.
- Kumar, B. & Cumal, L. (2016). UV-Vis, FTIR and antioxidant study of *Persea americana* (Avocado) leaf and fruit: A comparison. *Revista de la Facultad de ciencias químicas*, 14(1):13-20.
- Kuskoski, E.M, Asuero, A.G, Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. & Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4):726-732.
- Laincer, F., Laribia, R., Tamendjaria, A., Arrarb, L., Rovellinic P. & Venturini, S. (2014). Olive oils from Algeria: Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities. *Grasas y aceites*, 65(1):e001.
- Londoño, J.L. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(1):266-277.
- Mínguez-Mosquera, M.I. & Garrido-Fernández, J. (1989). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1):1-7.
- Mirbagheri, V.S., Alizadeh, E., Yousef-Elahi, M. & Esmaeilzadeh, B.S. (2018). Phenolic content and antioxidant properties of seeds from different grape cultivars grown in Iran. *Nat. Prod. Res.*, 32(4):425-429.
- Moon, J.K. & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.*, 57(2):1655-1666.
- Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S. & Bouaziz, M. (2010). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1):3235-41.
- Okpala, L.C. & Gibson-Umeh, G.I. (2013). Physicochemical properties of mango seed flour. *NIFOJ*, 31(1):23-27.
- Ozdemir, F. & Topuz, A. (2003). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and postharvesting ripening period. *Food Chem.*, 86(1):79–83.
- Pajak, P., Socha, R., Galkowska, D., Roznowski, J. & Fortuna, T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143(1):300-6.
- Peiretti, P.G., Meineri, G., Gai, F., Longato, E. & Amarowicz, R. (2017). Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural Product Research*, 31(18):2178-82.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2):337-41.
- Rafiee, Z., Jafari S.M., Alami, A. y Khomeiri, M. (2012). Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of Olive Leaves on Sunflower Oil., *J. Agr. Sci. Tech*, 14(1):1497-09.

- Requejo, A.M., Ortega, R.M., Robles, F, Navia, B., Faci, M. & Aparicio, A.** (2003) Influence of nutrition on cognitive function in a group of elderly, independently living people. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1):54–7.
- Restrepo-Duque, A.M., Londoño-Londoño, J., González-Álvarez, D., Benavides-Paz, Y. & Cardona-Salazar, B.L.** (2012). Comparación del aceite de aguacate variedad Hass cultivado en Colombia, obtenido por fluidos supercríticos y métodos convencionales: una perspectiva desde la calidad *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2):151-61.
- Rodríguez-Aguirre, O.E., Andrade-Barreiro, W.A. & Diaz-López, F.E.** (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2):21-36.
- Rosenblat, T., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A. & Zanin, Z.** (2011). Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.*, 303(4):239-46.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L., Gardner, P., Heinonem, M., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L., & Tijburg, L.** (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, 212(3): 319-328.
- Soong, Y.Y. & Barrow, P.J.** (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3):411-17.
- Sunil, S.R & Thiagarajan, P.** (2015). A Review on Persea Americana Mill. (Avocado) - Its Fruit and Oil. *International Journal of PharmTech Research*, 8(6):72-7.
- Wang, W., Bostic, T. R. & Gu, I.** (2010) Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chem.*, 122(4):1193-8.
- Wongnarat, C. & Srihanam, P.** (2017). Phytochemical and antioxidant activity in seeds and pulp of grape cultivated in Thailand. *Orient J. Chem.*, 33(1):113-121.
- Yadegarinia, D.L.** (2006). Biochemical activities of iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12):1249-55.
- Yuksel, A.A.** (2018). Physicochemical characteristics of extra virgin olive oils obtained by ultrasound assisted extraction from different olive cultivars. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 4(3):2018.

## 7.2 CAPÍTULO II. Determinación de la actividad antiinflamatoria del aceite de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) y la fracción metanólica en un modelo experimental de inflamación aguda e identificación de los principales compuestos activos.

### Resumen

El aceite de aguacate nativo mexicano presenta diversas propiedades, como la capacidad captadora de radicales libres, debido al contenido de compuestos bioactivos con alto potencial de mostrar actividad antiinflamatoria. Esta propiedad fue analizada en el presente trabajo, utilizando como modelo de estudio, el método de edema de pata en ratas Wistar inducido por carragenina mediante la administración de 50  $\mu$ L del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de la fracción metanólica derivado de éste, en una dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg, tanto de manera tópica como oral (tratamiento por 28 días). Así mismo, se cuantificaron e identificaron los principales compuestos de tipo fenólico y ácidos grasos o derivados, tanto del aceite como de la fracción, utilizando HPLC y CG-EM, respectivamente. Con el ensayo de aplicación tópica, se demostró que tanto el aceite de semilla de aguacate y la fracción metanólica a 1 mg/kg, tuvieron el mayor efecto antiinflamatorio a las 8 h con 70.85% y 72.21%, respectivamente. Esta actividad fue aproximadamente 1.8 veces más que al obtenido con la administración tópica de ibuprofeno (25 mg/kg), que presentó 39.61% de actividad antiinflamatoria. La actividad antiinflamatoria con la administración oral, se realizó con la aplicación de 50  $\mu$ L tanto del aceite como con la fracción metanólica en una única dosis, de 1 mg/kg, la que tuvo el mayor efecto con la aplicación tópica. A las 8 h después de la inducción de la inflamación, el aceite mostró un 68.6% de actividad antiinflamatoria y un 46.7% con la fracción metanólica, valores más altos que a lo observado con la administración de ibuprofeno (17.63%). En este ensayo, se consideró que el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano obtuvo la mayor actividad antiinflamatoria. Con el análisis de identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos, ácidos grasos y sus derivados, se sugiere que ambos tipos de compuestos son los responsables de la actividad antiinflamatoria.

**Palabras clave:** Aguacate nativo mexicano, carragenina, actividad antiinflamatoria, edema de pata en rata.

### Abstract

The native Mexican avocado oil has several properties, such as the ability of radical free scavenging, due to the content of bioactive compounds with high potential to show anti-inflammatory activity. This property was analyzed in the present study, using the method of carrageenan-induced paw edema in rat, with topical administration of 50  $\mu$ L of native Mexican avocado seed oil and the methanol fraction derived from this, at different doses (0.1, 1 and 10 mg/kg rat). With this assay, we showed that both the avocado seed oil and methanol fraction at doses of 1 mg/kg, shown the highest anti-inflammatory effect at 8 h of treatment with 70.85% and 72.21%, respectively. This activity was similar to that observed with the topical administration of ibuprofen (25 mg/kg), which presented a 39.61% of anti-inflammatory activity. The anti-inflammatory activity by oral administration was performed with the application of 50  $\mu$ L of both the

oil and the methanolic fraction in a single dose, of 1 mg/kg, which shown the greatest effect with topical application. At 8 h after induction of inflammation, the oil showed 68.6% of anti-inflammatory activity and 46.7% with the methanolic fraction, higher values than observed with the administration of ibuprofen (17.63%). In this assay, native Mexican avocado seed oil was considered to have the highest anti-inflammatory activity. The analysis of identification and quantification of phenolic compounds, fatty acids and their derivatives, suggested that both types of compounds are responsible for anti-inflammatory activity.

**Keywords:** Native Mexican Avocado, Carrageenan, Anti-inflammatory activity, paw edema in rat.

## Introducción

La inflamación es una respuesta del organismo ante la exposición a agentes infecciosos, estímulos antigénicos o lesiones físicas que involucra a los sistemas nervioso, vascular e inmunológico. Inicialmente tiene una función homeostática de protección o defensa que se caracteriza por rubor, dolor, tumefacción, edema y falta de función en la zona afectada, no obstante, si el proceso es ineficiente y se hace crónica, se transforma en un proceso fisiopatológico que favorece el incremento de inflamación y consecuentemente en estrés oxidativo (Pérez *et al.*, 2007)

Diversos antioxidantes de origen natural debido a su naturaleza para regular el desbalance del estrés oxidante, poseen la capacidad de reducir procesos inflamatorios con un alto potencial de fungir como una alternativa al uso de los antiinflamatorios comerciales, ya que algunos de ellos disminuyen el dolor y la inflamación, mediante la inhibición de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) o bloqueando la secreción de mediadores proinflamatorios (Domínguez *et al.*, 2012). Con la administración de extractos de Té verde (*Camellia sinensis*) se ha demostrado un efecto antiinflamatorio por la inhibición de COX-2 y diversas citocinas inflamatorias); así mismo, el extracto de falsa dulcamara (*Celastrus aculeatus*) y de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) tienen efecto antiinflamatorio, medido en modelos *in vivo* (Domínguez *et al.*, 2012; Caballero *et al.*, 2014; Medina-Remón *et al.*, 2016).

Algunos de los mediadores proinflamatorios como las interleucinas (IL) 1, 2, 6, 17, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, pueden ser bloqueados o disminuidos por extractos de origen vegetal, como lo registrado para el aceite de frutos de aguacate Cv. Hass (*Persea americana*) debido principalmente al contenido de ácidos grasos (ácido linoleico, ácido linolénico y ácido oleico) y de carotenoides ( $\beta$ -caroteno), con el que se reducen los niveles de IL-6 y NF- $\kappa$ B (Li *et al.*, 2013).

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune crónica y progresiva, caracterizada por la inflamación, dolor y destrucción ósea en las articulaciones periféricas, la cual es tratada por antiinflamatorios no esteroideos (AINES), fármacos

modificadores de la enfermedad (FARMES), agentes biológicos entre otras más (Domínguez *et al.*, 2012), donde los tratamientos se centran en la reducción de los síntomas producidos por la enfermedad y la disminución de citocinas proinflamatorias. La utilización de extractos de plantas ha demostrado que se reduce el daño producido por las especies reactivas aunado a la reducción de mediadores inflamatorios y reducción del dolor en algunos casos (Deliorman *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha evaluado la actividad antioxidante del aceite de aguacate, el contenido de compuestos fenólicos y los principales fitoquímicos antioxidantes presentes tanto en la pulpa, cáscara y semilla de diferentes variedades comerciales (Wang *et al.*, 2010; Restrepo *et al.*, 2012).

El aceite de los frutos del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) ha sido utilizado en la medicina tradicional de México (Gioanetto y Blas, 2000; Bello-González, 2006), pero son pocos los estudios encaminados a la determinación de algunas de sus propiedades medicinales. Aunque en nuestro grupo de trabajo se ha descrito que extractos lipídicos de la semilla de esta variedad de aguacate modulan la respuesta inflamatoria *in vitro*, disminuyendo la expresión de las citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$  (Báez-Magaña, 2014; Lara-Márquez *et al.*, 2018), no se han realizado estudios con el aceite obtenido de la semilla de esta variedad, dirigidos a determinar la actividad antioxidante y su relación con las propiedades antiinflamatorias *in vivo*.

Por lo anterior y debido a los resultados de la actividad antioxidante del aceite de aguacate nativo mexicano y a la fracción metanólica derivada de éste (Capítulo 1), en la presente investigación se determinó el efecto antiinflamatorio con el modelo de edema de pata en rata inducido por carragenina, mediante la administración tópica.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

**Semillas de aguacate nativo mexicano.** Los frutos fueron colectados en los meses de mayo a agosto de 2018, en plantas cultivadas en huertos de la región de Tingambato, Michoacán, México (19°30'6" Norte, 101°51'14" Oeste). Las semillas fueron separadas de los frutos y almacenadas en congelación (-20°C) hasta su uso.

**Animales.** Se utilizaron ratas Macho Wistar (*Rattus norvegicus*) de 3 meses de edad de 400 g. Éstas fueron reproducidas y mantenidas bajo condiciones de ciclos de luz de 12 h, en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, según las recomendaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio).

## Obtención del aceite y las fracciones

**Aceite de semillas.** El aceite se obtuvo por el método Soxhlet, utilizando 100 g de semilla pulverizada en nitrógeno líquido, por cada reflujo de hexano se usaron 1000 mL durante 6 h. En total se utilizó 1 kg de semilla pulverizada para la obtención del aceite.

**Fraccionamiento.** El aceite de aguacate nativo mexicano fue fraccionado por extracción líquido-líquido en la siguiente secuencia: Fracción 1 Metanólica y Fracción 2 Clorofórmica. Se utilizó un embudo de separación para la recuperación de cada una de las fracciones por separación de fases, éstas fueron evaporadas a sequedad y resuspendidas a una concentración de 100 mg/mL.

## Método para la determinación de la actividad antiinflamatoria

La inflamación se determinó por el método de edema de pata en rata inducido por carragenina (Winter *et al.*, 1962). Primeramente, se establecieron las condiciones de inducción del edema, administrando dos volúmenes, 25 y 50 µL de carragenina al 1% en una disolución NaCl al 0.9%), encontrando una mayor respuesta con el volumen de 50 µL. El edema fue inducido mediante la inyección subcutánea en el tejido plantar de la pata trasera derecha de ratas macho Wistar (n=5), determinando el volumen de la inflamación en mm, realizando mediciones con un micrómetro cada hora.

Debido a que a las 4 h de la inducción del edema se observó el máximo del volumen de la inflamación, a partir de este tiempo, cada hora se determinó la inflamación por 8h.

**Administración del aceite de aguacate y de la fracción metanólica.** Los ensayos fueron realizados con la administración de 50 µL del aceite y la fracción metanólica, en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/kg de rata). El aceite fue disuelto en aceite mineral y la fracción metanólica en dimetilsulfóxido (DMSO 5%).

Como controles, se usaron los siguientes tratamientos: Control de inflamación sin tratamiento (ST), Control de inflamación tratado con 25 mg/kg de Ibuprofeno (Ibu), Control de inflamación tratado con aceite mineral (AM) y Control de inflamación tratado con dimetilsulfóxido (DMSO 5%).

El porcentaje de la actividad antiinflamatoria de cada uno de los tratamientos, se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antiinflamatoria (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{mm de la extremidad a evaluar} - \text{mm de la extremidad sin inflamar}}{\text{mm que aumenta la extremidad durante la inflamación máxima}} \right) \times 100$$

**Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos mayoritarios.** El análisis se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando el equipo HP 1090 Series II, acoplado a una bomba de

separación LPG-3400RS y de auto-inyección WPS-3000, con un detector rápido de separación con arreglo de diodos (DAD-3000RS). Los compuestos fenólicos fueron separados mediante una columna HP C18 (4.6 x 150 mm; 5 $\mu$ m) a una temperatura de 30 °C. Los datos, integración de picos y calibración, se analizaron con el software Dionix Chromeleon (Version 6.80 RS 10).

Las condiciones del análisis de muestras, consistió en una fase móvil de acetonitrilo (disolvente A), una solución de ácido acético a pH 3.0 (disolvente B) y metanol (disolvente C), utilizando el siguiente programa de gradiente de elución: 0 min, 5%A/95%B; 10 min, 10%A /80%B /10%C; 20 min, 20%A /60%B /20%C y 30 min, 100%A.; con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10  $\mu$ l. La detección se realizó con ultravioleta (UV) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) específica para compuestos fenólicos:  $\lambda$  280 nm por 18.0 min con un cambio a  $\lambda$  320 nm y mantenida por 6 min, finalmente se cambió a  $\lambda$  380 nm, dejando en un rango de 200 nm a 700 nm. Con estas condiciones y longitudes de onda, se realizó la detección (identificación) y cuantificación de ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido elágico, ácido vainílico, catequina, epicatequina, quercetina y rutina (Sigma-Aldrich, México).

Cada compuesto fue preparado en una concentración de 10  $\mu$ g/mL y se mezclaron para tener una solución estándar, que después de preparada fue mantenida en oscuridad a 5 °C, utilizada como estándar para corroborar la identidad de cada compuesto. La cuantificación se obtuvo por comparación de los picos obtenidos de cada compuesto estándar, utilizando el tiempo de retención y mediante curvas de calibración, establecidas con las áreas de cada pico respectivas a cada concentración. Los datos se representan como la media  $\pm$  la desviación estándar de análisis independiente por triplicado.

**Cuantificación e identificación de ácidos grasos y derivados del aceite y fracción metanólica de semilla de aguacate.** Tanto el aceite como la fracción metanólica de éste, obtenido de semillas de aguacate nativo mexicano, fueron sometidos a un proceso de derivatización, previo al análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM). Ambos fueron llevados a sequedad con nitrógeno gaseoso, se les adicionó 100  $\mu$ L de diclorometano (J.T. Baker) y 1 mL de NaOH 0.5 N en metanol. La mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos y se enfrió hasta 30°C para posteriormente adicionar 1 mL de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol para catalizar la reacción y calentar nuevamente a 90°C por 10 minutos. Después, se bajó la temperatura hasta alcanzar los 30°C y se le adicionó 1 mL de hexano, la mezcla se agitó en un vortex por 30 seg y se dejó reposar para permitir la separación de las dos fases, recuperando la fase superior correspondiente a la fase orgánica, colocándola en un tubo de ensayo, limpio y seco. A la fase acuosa (fase inferior) nuevamente se le adicionó 1 mL de hexano y se repitió el paso anterior para obtener de nuevo la fase orgánica, la cual se mezcló con la obtenida previamente. A ésta se le agregó 1 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente, recuperando de nuevo solo la fase orgánica, la que se pasó por una columna para cromatografía (Poly-prep, Chromatography columns, Bio-Rad) empacada con NaSO<sub>4</sub>, el filtrado se recolectó y

se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso (grado HPLC) para ser analizado por CG-EM.

La identificación de los compuestos se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 series II; Agilent, Foster City, Ca. U.S.A.) con detector de masas 5973 (Agilent Technologies), con la columna HP-5MS (30 m de longitud, 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y con 0.25  $\mu\text{m}$  de film. El gas acarreador fue helio ultra puro en flujo constante de 1 mL/min, usando un volumen de inyección de la muestra fue 1  $\mu\text{L}$ , tipo Split a una temperatura del inyector de 270°C, la temperatura del detector fue de 300°C. Las condiciones de operación del horno fueron las siguientes: la temperatura inicial fue de 150°C por 3 min, con un incremento gradual de 5°C por minuto hasta 278°C mantenida por 12 minutos (tiempo total de 40.6 minutos) y una post-corrída a 300°C por 3 minutos. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH, "Chem Station" Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002), la cuantificación se realizó con el área bajo la curva de cada uno de los picos correspondientes a los compuestos (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013).

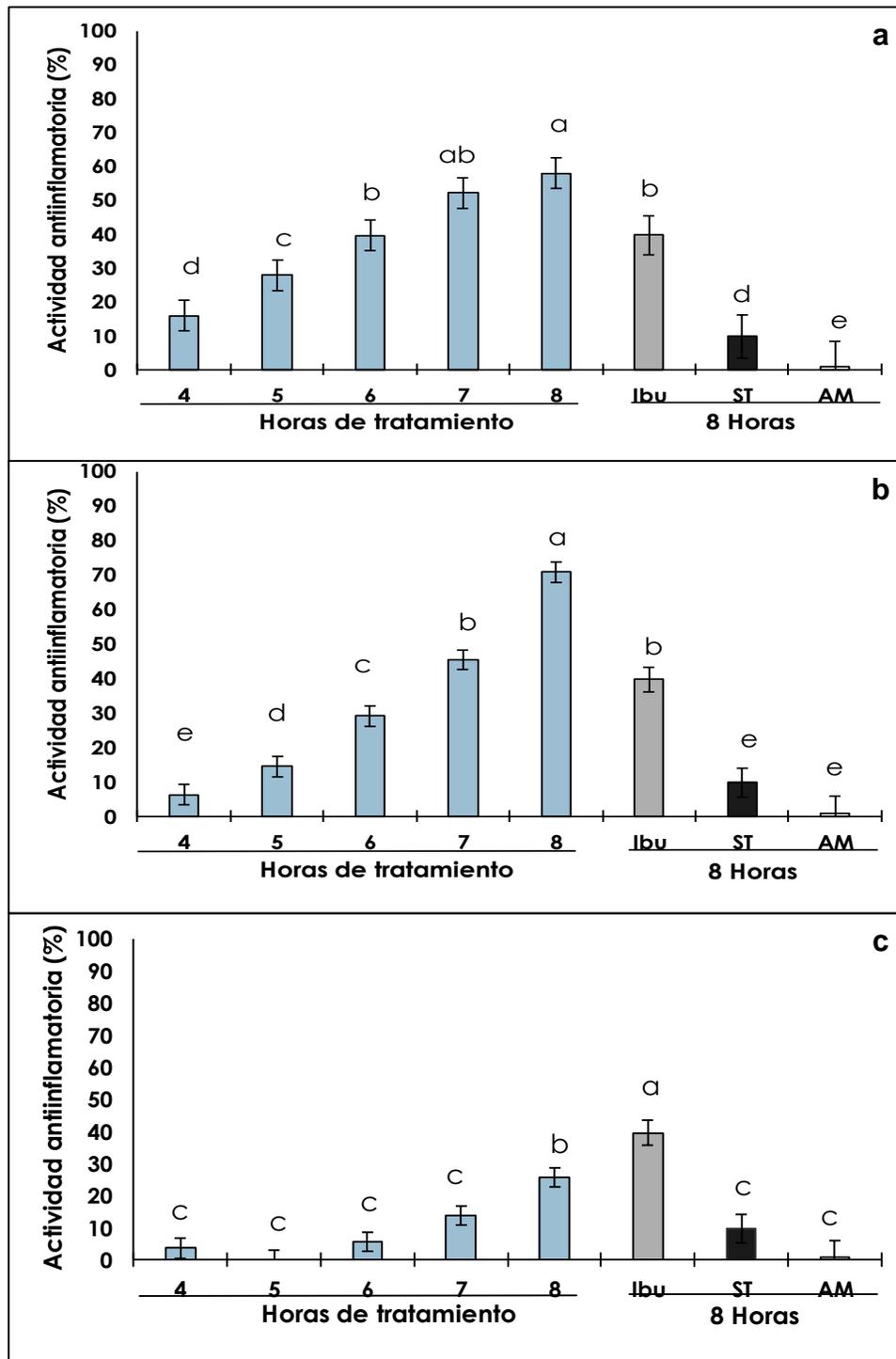
**Análisis estadístico.** Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se expresaron a través de la media  $\pm$  desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Se utilizó el software JMP.

## Resultados y discusión

Para determinar la actividad antiinflamatoria con el ensayo de edema en pata de rata inducido con carragenina, se administraron tanto el aceite de las semillas de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) como la fracción metanólica obtenida de éste, fueron administrados de manera tópica y oral, con un tratamiento de 28 días. Con este ensayo, se demostró la actividad antiinflamatoria, la que dependió de cada una de las dosis. Así mismo, se realizó la identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios tanto del aceite como de la fracción metanólica, con el fin de establecer los posibles metabolitos responsables de dicha actividad.

### Actividad antiinflamatoria con administración tópica

Los resultados indican un efecto antiinflamatorio dependiente de las dosis del aceite y del tiempo de inducción del edema, ya que en las tres dosis se observó una mayor actividad que los controles de inflamación sin tratamiento (ST) y con aceite mineral (AM). Desde las 4 h, el máximo del volumen del edema inducido por carragenina, con la aplicación de 0.1 mg/kg de aceite se observó una disminución del edema con 15.88% de actividad antiinflamatoria, aumentando cada hora, alcanzando la máxima actividad a las 7 h con 52.14%, con un ligero aumento a las 8 h (57.94%), aunque sin diferencia significativa entre ellos. Estos valores fueron mayores que el presentado con la aplicación del ibuprofeno (39.61%) (Figura 6a).



**Figura 6.** Porcentaje de actividad antiinflamatoria del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) administrado de manera tópica en tres dosis: a) 0.1; b) 1; c) 10 mg/kg. Control de inflamación sin tratamiento (ST), control de inflamación tratado con 25 mg/kg de ibuprofeno (Ibu) y control de inflamación tratado con aceite mineral (AM). Letras distintas muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).

De manera similar, se observó un efecto antiinflamatorio con la dosis de 1 mg/kg del aceite, aunque a las 8 h se presentó la mayor actividad antiinflamatoria, alcanzando un 70.85%, 1.8 veces más que el ejercido por el ibuprofeno (Figura 6b). Sin embargo, con la dosis más alta probada (10 mg/kg), se mostró un menor efecto antiinflamatorio, encontrando un máximo porcentaje de actividad a las 8 h con 25.77%, una menor actividad que la producida por el ibuprofeno (Figura 6c).

La actividad antiinflamatoria de la fracción metanólica obtenida del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, fue similar al observado con la aplicación del aceite, con un 49.53% a las 8 h en la dosis de 0.1 mg/kg (Figura 7a). Con la dosis de 1 mg/kg se tuvo un 72.21% (Figura 7b), 1.82 veces más que el efecto del ibuprofeno y un valor igual al presentado por el aceite (70.85%).

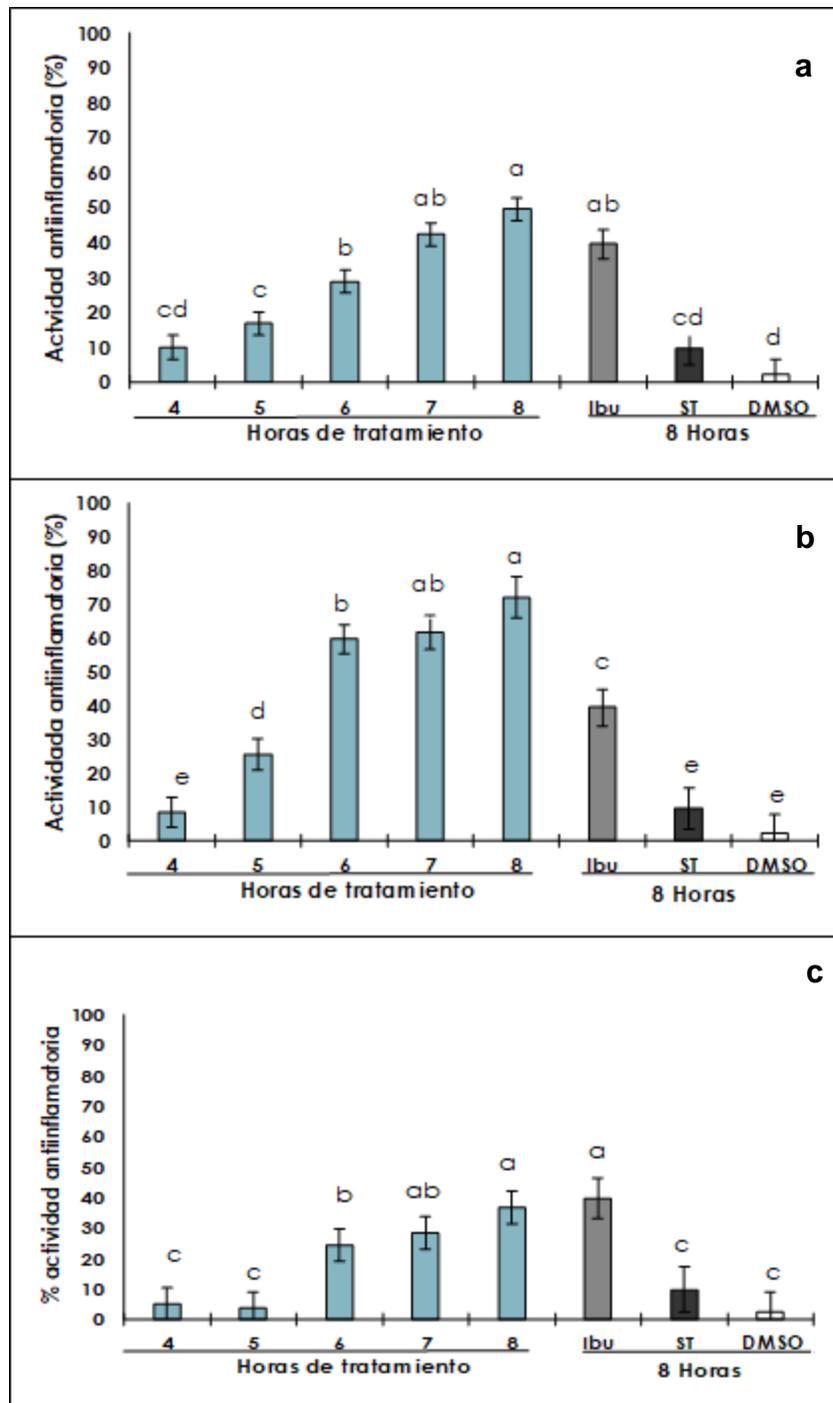
Es notable un mayor efecto de esta dosis de la fracción en comparación con la del aceite, ya que, desde las 6 h, la actividad antiinflamatoria fue mayor al 50% (59.78%). Incluso, con la dosis de 10 mg/kg de la fracción, el efecto antiinflamatorio fue similar al de ibuprofeno a las 8 h, ya que alcanzó un porcentaje de actividad similar (36.65%), sin diferencias significativas entre éstos (Figura 7c).

Los resultados de la actividad antiinflamatoria con la administración tópica del aceite y de la fracción metanólica, obtenidos en la presente investigación, demuestran una alta actividad, principalmente en la dosis de 1 mg/kg, ya que esta dosis es menor que la reportada para la indometacina a 10 mg/kg a las 6 h (Deliorman *et al.*, 2007) y al ketoprofeno a 10 mg/kg también a las 6 h (Villalobos-Osorio, 2017), pero igual a la que ejerce la dexametasona (1 mg/kg a las 6 h) (Villalobos-Osorio, 2017).

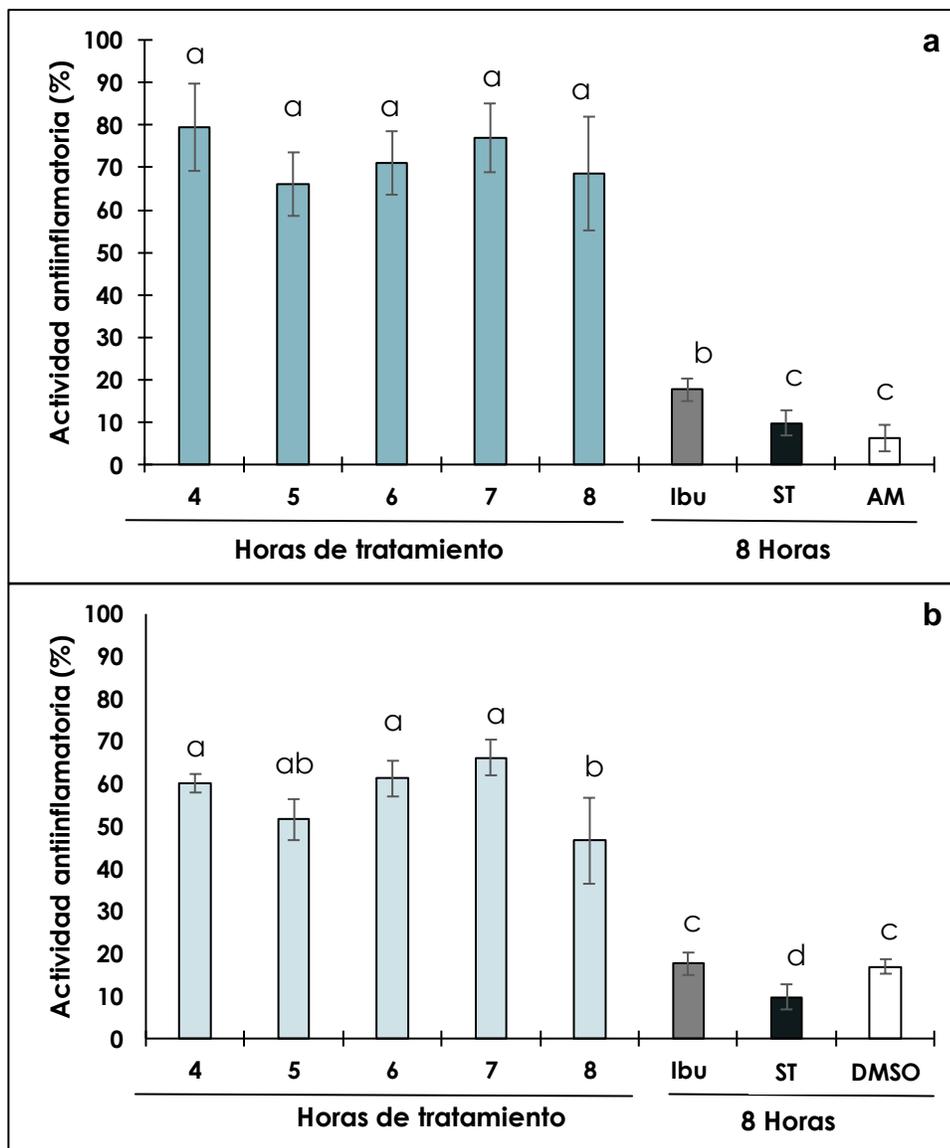
### **Actividad antiinflamatoria con administración oral**

Con la determinación del efecto antiinflamatorio con administración oral del aceite de las semillas de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) y la fracción metanólica obtenida de éste, aplicados solo en la concentración de mayor efecto obtenido durante la administración tópica (1 mg/kg). Con el aceite, se observó un porcentaje de actividad antiinflamatoria alta desde las 4 h (79.55%), el cual se mantuvo sin cambios estadísticamente significativos al obtenido a las 8 h, tiempo en el que se obtuvo un 68.6% (Figura 8a). Este valor es mucho más alto que el ejercido por el ibuprofeno a la dosis de 25 mg/kg, con el que solo se observó un 17.63%, ligeramente mayor al que mostraron las ratas no tratadas (ST) con 9.7% y al de las tratadas con el aceite mineral (AM), el vehículo del aceite de semilla (6.7%) (Figura 8a).

La actividad antiinflamatoria determinada en ratas tratadas con la fracción metanólica fue similar a la observada con el aceite, alcanzando un valor máximo de porcentaje de la actividad (66.17%) a las 7 h de la inducción de la inflamación, sin diferencias significativas al producido a las 4 h (60.1%). Sin embargo, a las 8 h, la fracción metanólica en la dosis de 1 mg/kg disminuyó el efecto, mostrando un 46.7% de actividad antiinflamatoria (Figura 8b).



**Figura 7.** Porcentaje de actividad antiinflamatoria de la fracción metanólica del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) administrado de manera tópica en tres dosis: 0.1 (a), 1 (b) y 10 (c) mg/kg. Control de inflamación sin tratamiento (ST), control de inflamación tratado con 25 mg/kg de Ibuprofeno (Ibu) y control de inflamación tratado con dimetilsulfóxido (DMSO 5%). Letras distintas muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).



**Figura 8.** Porcentaje de actividad antiinflamatoria con administración oral en dosis única de 1 mg/kg durante 28 días, del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) (a) y de la fracción metanólica de éste (b). Control de inflamación sin tratamiento (ST), control de inflamación tratado con 25 mg/kg de ibuprofeno (Ibu), control de inflamación tratado con dimetilsulfóxido (DMSO 5%) y control de inflamación tratado con aceite mineral (AM). Letras distintas muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).

De igual manera que en el ensayo con la administración del aceite, el ibuprofeno y el DMSO 5% no producen un efecto antiinflamatorio. El ibuprofeno no mostró un efecto protector, lo cual concuerda con el periodo de eliminación de éste, que resulta ser de 8 a 15 h después de la administración (Sharma *et al.*, 2003). Aunque con estos resultados, se demuestra que tanto el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) y la fracción metanólica tienen un alto efecto antiinflamatorio, ya que la actividad estuvo en un rango de 66.17 a 79.55%, el valor observado con el aceite, es considerado como el de mayor efecto.

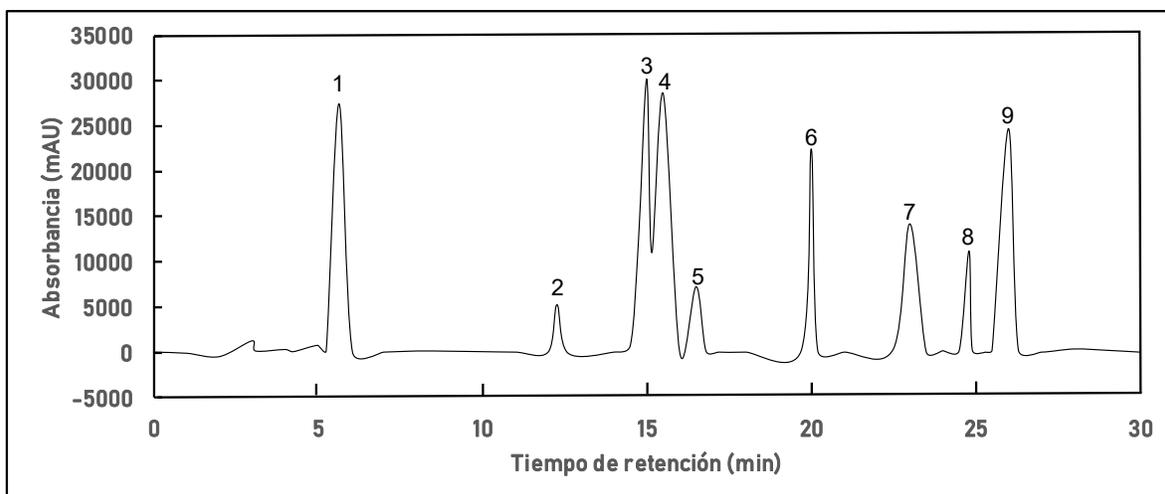
Extractos hexánicos de *Pterodon emarginatus* (Leguminosae/Papilionaceae) en una dosis de 500 mg/kg de rata, han mostrado hasta un 45% de actividad antiinflamatoria a 6 horas (Carvalho *et al.*, 1999), un porcentaje menor a lo obtenido por el aceite de aguacate, al mismo tiempo. La dosis utilizada para aceite de aguacate muestra tener una actividad antiinflamatoria similar a lo reportado para indometacina a 10mg/kg con 82% de actividad antiinflamatoria (Chio *et al.*, 2004), mientras que la fracción metanólica del aceite de aguacate muestra tener comportamiento similar a lo reportado en extractos metanólicos de frutos de *Foeniculum vulgare* a 200 mg/kg de rata, con un 45% de actividad antiinflamatoria (Chio *et al.*, 2004).

### **Principales compuestos fenólicos del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de la fracción metanólica**

Con el análisis realizado por HPLC para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos mayoritarios tanto del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano como de la fracción metanólica de éste, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes de una corrida por 30 min, los que fueron comparados con el cromatograma de una solución mezcla de estándares de compuestos fenólicos, presentando una óptima separación y resolución, consiguiendo un tiempo de retención (Tr) constante para cada compuesto (Cuadro 3, Figura 9).

**Cuadro 3.** Compuestos fenólicos de la solución de mezcla de estándares, analizados por HPLC (10 µg/mL).

No. de Pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Miliunidades de Absorbancia (mAU)
1	Ácido gálico	5.64	27500
2	Catequina	12.27	5250
3	Ácido vainílico	15	30250
4	Ácido cafeico	15.5	28600
5	Epicatequina	16.5	7250
6	Ácido p-cumárico	20	22500
7	Rutina	23	14200
8	Ácido elágico	24.8	11200
9	Quercetina	26	24750



**Figura 9.** Cromatograma de la solución mezcla estándar de compuestos fenólicos analizado por HPLC. Picos: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido vainílico; 4, ácido cafeico; 5, epicatequina; 6, ácido p-cumárico; 7, rutina; 8, ácido elágico; 9, quercetina.

En el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano se observó un contenido bajo de los ácidos fenólicos como el ácido gálico, el ácido vainílico, el ácido cafeico y el ácido p-cumárico, así como el ácido elágico. Sin embargo, el contenido de flavonoides como catequina, epicatequina, rutina y quercetina fue más alto, considerando como compuestos mayoritarios a la catequina y a la epicatequina, con 34.2 y 21.2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Contenido de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) y de fracción metanólica.

No.	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Aceite	Fracción metanólica
			$\mu\text{g/mL}$	
1	Ácido gálico	5.64	1.21	2.71
2	Catequina	12.27	34.2	70.7
3	Ácido vainílico	15	0.69	1.11
4	Ácido cafeico	15.5	1.1	2.3
5	Epicatequina	16.5	21.12	37.7
6	Ácido p-cumárico	20	0.74	1.76
7	Rutina	23	17.71	51.2
8	Ácido elágico	24.8	0.27	3.12
9	Quercetina	26	15.8	63.7

El contenido de la fracción metanólica fue similar al aceite, aunque con un contenido mayor tanto de ácidos fenólicos, ácido elágico y flavonoides, presentando un contenido mayor también de catequina, además de quercetina, rutina y epicatequina. El mayor contenido fue para la catequina con 70.7 µg/mL, quercetina con 63.7 µg/mL y rutina con 51.2 µg/mL) (Cuadro 4).

Diversos compuestos fenólicos han sido reportados en diversas variedades de aguacate, como lo reportados por Kosinska (2012), que señala que las semillas de aguacate en dos variedades (Hass y Shepard) poseen derivados de ácido cafeico, derivados de ácido p-cumárico, procianidinas y catequina/epicatequina. La quercetina inhibe la liberación de oleato de ácido mirístico en fosfolípido marcados con fosfolipasa A2 extracelular (en líquido sinovial y plasma). La rutina fue demostrada con capacidad antiinflamatoria probada con adyuvante en modelos artríticos en ratas teniendo mayor capacidad en fase crónica (Guardia *et al.*, 2001).

Catequina y epicatequina inhiben la activación inducida por TNF- $\alpha$ , NF-kB y, por lo tanto, la liberación de proteínas proinflamatorias y mediadores como IL-8 y activación de uroquinasa (Kurbitz *et al.*, 2011). Los flavonoides intervienen en respuestas inmunológicas no específicas (reacciones inflamatorias agudas) al suprimir la fagocitosis de los macrófagos, la liberación de especies reactivas por los neutrófilos y la activación de los mastocitos. La actividad antioxidante o de eliminación de radicales libres de los flavonoides se ha relacionado con el número y la posición de los grupos hidroxilo libres, que podrían actuar por su capacidad de donación de hidrógeno (Guardia *et al.*, 2001).

### **Ácidos grasos y derivados del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de la fracción metanólica**

En el aceite y en la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), se identificaron diversos compuestos por CG-EM que se agruparon en derivados de ácidos grasos (acetogeninas alifáticas) y ácidos grasos de cadena larga, los que fueron cuantificados como porcentajes. Entre las acetogeninas alifáticas, las mayoritarias fueron los ácidos grasos polihidroxilados con un 16.42% y el ácido 9,12-Octadecadienoico con un 16.09% (Cuadro 5). Los mayores porcentajes fueron obtenidos en el aceite, con hasta un 50% menos compuestos en la fracción metanólica. En la figura 10 se muestra un cromatograma representativo del perfil de los ácidos grasos y derivados, presentes en el aceite de la semilla de aguacate mexicano.

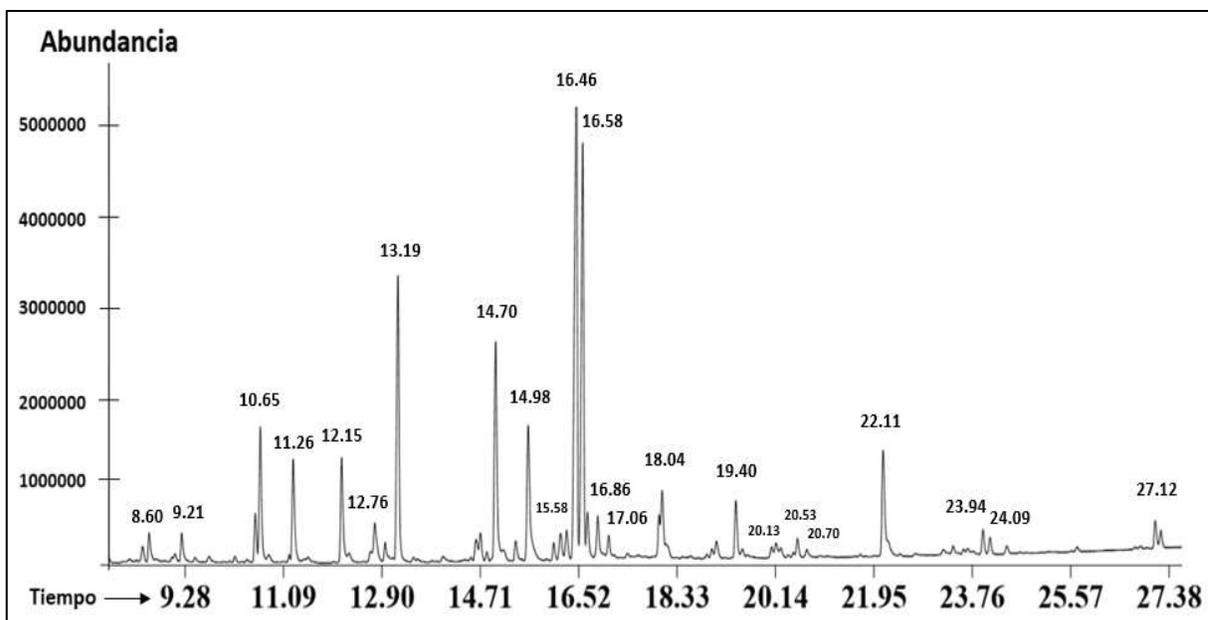
En la fracción metanólica se identificaron diversos compuestos, la mayoría de estos son ácidos grasos de cadena larga donde el predominante de éstos es el ácido 9,12-Octadecadienoico y el ácido 9-octadecenoico con 15.31% y 12.65% respectivamente y diversos derivados de ácidos grasos pertenecientes a acetogeninas alifáticas como ácidos grasos polihidroxilados con 16.14%.

**Cuadro 5.** Contenido de ácidos grasos y derivados identificados y cuantificados por CG-EM del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*).

Grupo	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Contenido (%)
Derivados de ácidos grasos (Acetogeninas alifáticas)	Avocatinas	8.60 10.65 12.15	9.7332
	Ácidos grasos polihidroxilados	11.26 14.70 14.98 15.58	16.4263
	Persina	18.04	3.9503
	Persenona A	19.40	2.1559
	Pahuatinas	20.13 22.11	5.1518
Ácidos grasos de cadena larga	Ácido tridecanoico	9.21	1.1841
	Ácido 9-Hexadecenoico	12.76	1.9349
	Ácido Hexadecanoico	13.19	7.8251
	Ácido 9,12-Octadecadienoico	16.46	16.0902
	Ácido 9-Octadecenoico	16.58	12.075
	Ácido 10-Octadecenoico	16.86	1.6159
	Ácido Octadecanoico	17.06	1.1122
	Ácido 11-Eicosenoico	20.53	0.7662
	Ácido Eicosanoico	20.70	0.3126
	Ácido 13-Docosenoico	23.94	0.6435
	Ácido Docosanoico	24.09	0.4518
Ácido 15-Tetracosenoico	27.12	1.3446	

Diversos ácidos grasos han sido identificados en distintos cultivares de aguacate, donde la cantidad y tipo depende de la variedad. Se ha sido identificado que el ácido hexadecanoico (ácido palmítico) es uno de los principales ácidos grasos saturados encontrados, el ácido octadecanoico (ácido esteárico) es el ácido graso mono insaturado mayoritario reportado y el ácido octadecenoico (ácido linoleico) como ácido graso mayoritario poliinsaturado encontrados en la semilla del cultivar Fortuna, Collinson y Barker (Galvao *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que diversos ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico pueden actuar como agente antioxidante y prevenir el daño al ADN (Beeharry *et al.*, 2003), El ácido esteárico ha demostrado tener un efecto reductor de colesterol en sangre, lo cual podría indicar una disminución de estrés oxidativo por altos niveles de grasas en sangre (Bonanome *et al.*, 1988), de igual manera se ha demostrado en modelos *in vitro* de DPPH que diversos compuestos polihidroxilados presentan propiedades antioxidantes (Ley *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2011; Ziaullah *et al.*, 2013).



**Figura 10.** Cromatograma del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), obtenido por cromatografía de gases.

Los porcentajes de actividad antiinflamatoria obtenidas con el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, sugieren que se debe al alto contenido de ácidos grasos de cadena corta, los carotenoides y compuestos fenólicos, lo que concuerda por lo reportado por Lin *et al.* (2017) y Rosenblat *et al.* (2011). Los extractos apolares o aceites de diversos frutos como de *Rosa canina* (Deliorman *et al.*, 2007), *Ficus maitin* (Villalobos-Osorio, 2017) y de aguacate, han demostrado tener actividad antiinflamatoria, por el contenido de compuestos bioactivos como carotenoides, ácidos grasos de cadena larga, los que además tienen capacidad antioxidante (Soong y Barrow, 2004; Wang *et al.*, 2010; Rosenblat *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2012).

La actividad antiinflamatoria del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, sugiere que previene la respuesta inflamatoria, posiblemente debido al alto contenido de derivados de ácidos grasos, los carotenoides y compuestos fenólicos (Lin *et al.*, 2017; Rosenblat *et al.*, 2011). En base a estos resultados, se propone el desarrollo de más estudios tanto con el aceite de aguacate nativo mexicano como con la fracción metanólica, que confirmen su actividad antiinflamatoria y su relación con un efecto antiartrítico con ensayos *in vivo*, así como identificar los posibles compuestos responsables de estas propiedades.

## Conclusión

El aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y la fracción metanólica derivada de éste a una dosis de 1 mg/kg, mostraron la mayor actividad antiinflamatoria (70.85% y

72.21%, respectivamente) con la administración tópica, que concuerda con la actividad antioxidante anteriormente determinada.

Con la administración oral, el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano en la dosis de 1 mg/kg, a las 8 h después de la inducción de la inflamación, se observó la mayor actividad antiinflamatoria (66.8 %), que fue similar a la mostrada por la fracción metanólica (66.17%) pero a las 7 h después de la inducción de la inflamación.

Con el análisis de identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos, ácidos grasos y sus derivados, se sugiere que ambos tipos de compuestos son los responsables de la actividad antiinflamatoria.

## Referencias

- Báez-Magaña, M. (2014).** Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. *Tesis de Maestría en Ciencias en Biol. Exp., IIQB-UMSNH*, 83 p.
- Beeharry, N., Lowe, J. E., Hernandez, A. R., Chambers, J. A., Fucassi, F., Cragg, P. J. & Green, I. C. (2003).** Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 530(1-2):27-33.
- Bello-González, G.M.A. (2006).** Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.
- Bello-González, G.M.A., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez B.N. & Salgado-Garciglia, R. (2015).** Plantas útiles de la comunidad indígena nuevo san juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, 9(39):175-215.
- Bonanome, A., & Grundy, S. M. (1988).** Effect of Dietary Stearic Acid on Plasma Cholesterol and Lipoprotein Levels. *New England Journal of Medicine*, 318(19):1244–8.
- Caballero, E., Soto, C., Olivares, A. & Altamirano, C. (2014).** Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-Type production catalyzed by commercial immobilized lipases. *PLoS ONE*, 9(9):e107749.
- Cardona-Galeano, W., Robledo-Restrepo, S.M., Rojanoll, B.A., Alzate-Guarini, F., Muñoz-Herrera, D.L. & Saez-Vega, J. (2013).** Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2):268-277.
- Carvajal, Z., Nolasco, H., Aguilar, U., Melo, S., Hayward, J. & Barradas, D. (2014).** Effect of dietary intake of avocado oil and olive oil on biochemical markers of liver function in sucrose-fed rats. *BioMed Research International*, 2014(1):8.
- Carvalho, J. C., Sertié, J. A., Barbosa, M. V., Patrício, K. C., Caputo, L. R., Sarti, S. J. & Bastos, J. K. (1999).** Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(2):127-133.
- Choi, E., & Hwang, J. (2004).** Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*, 75(6):557-565.
- Deliorman, D., Hartevioglu, A., Kupeli, E. & Yasilada, E. (2007).** In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*. 112(1):394-400

- Domínguez, H. L., Hohlatcheff, A. A. & Montiel, H. J.** (2012). Tratamientos farmacológicos contra alternativos en el manejo de pacientes con artritis reumatoide. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, 43(2):2012
- Dreher, L. & Davenport, J.** (2014). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7):738–50.
- Gioanetto, F. & Blas, M.** (2000). Etnobotánica de la meseta P'urepecha, CRIC, Roma.
- González-Torres, M.C., Betancourt-Rule, M. & Ortiz-Muñiz, R.** (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1):3-9.
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juárez, A. O., & Pelzer, L. E.** (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacología*, 56(9):683–7.
- Guo, L., Manh, T., Hwan, K., Myoung, E., Yu, H., Na, Y., Sik, Sam., Pyo, H. & Shik, Y.** (2008). Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *European Journal of Pharmacology*, 591(2008):293–9.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., & Dykes, G. A.** (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18):4613-9.
- Kroes, B., van den Berg, A., Quarles van Ufford, H., van Dijk, H., & Labadie, R.** (1992). Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid. *Planta Medica*, 58(06), 499–504.
- Kürbitz, C., Heise, D., Redmer, T., Goumas, F., Arlt, A., Lemke, J., & Trauzold, A.** (2011). Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. *Cancer Science*, 102(4)728–34.
- Kürbitz, C., Heise, D., Redmer, T., Goumas, F., Arlt, A., Lemke, J., & Trauzold, A.** (2011). Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. *Cancer Science*, 102(4):728–34.
- Li, Z., Wong, A., M.Henning, S., Zhang, Y., Jones, A., Zerlin, A., Thamen, G., Bowerman, S., Tseng, C. & Heber, D.** (2013). Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. *Food Funct*, 4:(2013):384.
- Lin, T.-K., Zhong, L., & Santiago, J.** (2017). Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1):70.
- Londoño, J.L.** (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(1):266-77.
- Medina-Remón, A., Casas, R., Tresserra-Rimbau, A., Ros, E., Martínez-González, M. A., & Fitó, M.** (2016). Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1):114–28.
- Mínguez-Mosquera, M.I. & Garrido-Fernández, J.** (1989). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1):1-7.
- Lara-Márquez, M., Spagnuolo, P.A., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J.E.** (2018). Cytotoxic mechanism of long-chain lipids extracted from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on colon cancer cells. *Experimental Biology Annual Meeting, American Societies for Experimental Biology*

- (EB2018) Meeting, American Societies for Experimental Biology Meeting **ASBMB**. San Diego, California. 21-25 de abril de 2018.
- Restrepo-Duque, A.M., Londoño-Londoño, J., González-Álvarez, D., Benavides-Paz, Y. & Cardona-Salazar, B.L.** (2012). Comparación del aceite de aguacate variedad Hass cultivado en Colombia, obtenido por fluidos supercríticos y métodos convencionales: una perspectiva desde la calidad *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2):151-161.
- Rodríguez-Aguirre, O.E., Andrade-Barreiro, W.A. & Díaz-López, F.E.** (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2):21-36.
- Rosado-Pérez J & Mendoza-Núñez VM** (2007). Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 32(2):58-69.
- Rosenblat, T., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A. & Zanin, Z.** (2011). Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.*, 303(4):239-46.
- Sharma, P. K., Garg, S. K., & Narang, A.** (2003). *Pharmacokinetics of Oral Ibuprofen in Premature Infants. The Journal of Clinical Pharmacology*, 43(9):968–973.
- Soong, Y.-Y. & Barrow, P.J.** (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit sedes. *Food Chemistry*, 88(3):411-417.
- Velázquez-Becerra, C., L. I. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, I. Flores-Cortez, G. Santoyo, C. Hernández-Soberano & E. Valencia-Cantero** (2013). "The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro." *Protoplasma*, 250(6):1251-1262.
- Wang, W., Bostic, T. R. & Gu, I.** (2010) Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. 122(4):1193-8.
- Winter, CA., Risley, EA. & Nuss, GW.** (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111(1):544–7.
- Zhou, D.-Y., Qin, L., Zhu, B.-W., Wang, X.-D., Tan, H., Yang, J.-F., & Murata, Y.** (2011). Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Food Chemistry*, 129(4)1591–7.
- Ziaullah, Bhullar, K. S., Warnakulasuriya, S. N., & Rupasinghe, H. P. V.** (2013). Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant capacity and tyrosinase inhibition activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(3)684–92.

### **7.3. CAPÍTULO III. Efecto antiinflamatorio y antiartrítico del aceite y la fracción metanólica de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en ratas artríticas.**

#### **Resumen**

El aceite y la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) presentaron un efecto antiinflamatorio y antiartrítico, demostrado en el modelo de ratas macho Wistar con inducción de artritis por adyuvante incompleto de Freund y por colágeno II. El aceite y la fracción metanólica fueron administrados vía oral por 28 días en una dosis de 1mg/kg, determinando su efecto sobre la inflamación en pata (mm) y los síntomas característicos mediante un índice artrítico cualitativo (0-4). En la experimentación se evaluaron grupos de ratas (n=3) control no artríticas sin tratamiento (NO-AR), artríticas sin tratamiento (AR), artríticas tratadas con dexametasona (DEX-AR, 0.01 mg/kg) y dexketoprofeno (DKE-AR, 0.1 mg/kg). El efecto antiartrítico y antiinflamatorio se observó a partir de los 10 días del tratamiento determinantes en la disminución del edema en la pata, con valores de 5.89mm  $\pm$  0.01 y 6.87mm  $\pm$  0.23 respectivamente, en comparación de la alta inflamación del grupo AR con 8.4mm  $\pm$  2.26; el aceite y la fracción metanólica mantuvieron un índice artrítico de entre 1 y 2 a lo largo del tratamiento, registrando el aceite un índice menor, disminuyendo los síntomas artríticos típicos de la enfermedad en comparación con el grupo AR, que mostró una puntuación de 4. En las ratas artríticas tratadas con el aceite y la fracción metanólica, se mantuvieron los niveles aceptables de glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol, triglicéridos, disminuyendo el factor reumatoide y la proteína C reactiva, lo que sugiere un control de la enfermedad previniendo posible daño a hígado y riñón. Sin embargo, en ratas artríticas no tratadas, la inflamación y desarrollo de la enfermedad se relacionaron con los niveles altos de ácido úrico, creatinina y colesterol total. El efecto antiinflamatorio y antiartrítico del aceite de la semilla de aguacate nativo mexicano, puede atribuirse al contenido de los ácidos grasos de cadena larga como ácido palmítico, oleico, linoleico, ácidos grasos polihidroxilados, persina y ácido behénico, así como algunos compuestos de naturaleza fenólica.

**Palabras clave:** Biomarcadores, Proteína C, Factor Reumatoide, Ácidos grasos de cadena larga.

#### **Abstract**

The oil and methanolic fraction of native Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) shown an anti-inflammatory and antiarthritic effects, demonstrated in arthritic Wistar male rat induced by type II collagen and incomplete Freund's adjuvant. Oil and methanolic fraction were administered orally for 28 days at a dose of 1 mg/kg, determining their effect on leg inflammation (mm) and characteristic symptoms using a qualitative arthritic index (0-4). In addition, rat groups of untreated non-arthritic control (NO-AR), untreated arthritic (AR), arthritic rats treated with dexametasone (DEX-AR,

0.01 mg/kg) and dexketoprofen (DKE-AR, 0.1 mg/kg) were evaluated. The antiarthritic and anti-inflammatory effects were observed at 10 days of treatment due that decrease of edema in the leg, with values of  $5.89\text{mm} \pm 0.01$  and  $6.87\text{mm} \pm 0.23$  respectively, compared to the high inflammation of the AR group with  $8.4\text{mm} \pm 2.26$ ; oil and the methanolic fraction maintained an arthritic index of between 1 and 2 throughout the treatment, recording the oil a lower index, decreasing the typical arthritic symptoms of the disease compared to the AR group, which showed a score of 4. In arthritic rats treated with oil and the methanolic fraction the levels of glucose, urea, uric acid, creatinine, total cholesterol and triglycerides were maintained; interestingly, decreased the rheumatoid factor and C-reactive protein, suggesting a control of prevent possible liver and kidney damage. However, in untreated arthritic rats, inflammation and disease development were related to high levels of uric acid, creatinine and total cholesterol. The anti-inflammatory and antiarthritic effects of native Mexican avocado seed oil can be attributed to the high content of long-chain fatty acids such as palmitic acid, oleic, linoleic, polyhydroxylated fatty acids, persine and behenic acid as well as such as some phenolic compounds.

**Keywords:** Biomarkers, Protein C, Rheumatoid Factor, Long chain fatty acids.

## Introducción

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune sistémica crónica de origen desconocido (Prada *et al.*, 2015), la cual es poliarticular progresiva y destructiva, asociada con dolor e inflamación, disminuyendo la calidad de vida y aumentando la mortandad, su prevalencia dentro del hemisferio occidental es del 1% al 5% del total y sus manifestaciones clínicas aparecen entre la tercera y quinta década de edad, con una predilección hacia mujeres que hombre de 3 a 1 (Díaz-Rojas *et al.*, 2016). El origen destructivo de las lesiones producidas por la inflamación son resultado de la respuesta inmune y no-antígeno específico del proceso de inflamación. Esta respuesta inflamatoria se caracteriza por el aumento de diversas moléculas como las interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL6, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ ), diversas moléculas derivadas del ciclo del ácido araquidónico (PG2, COX1, COX2, entre otras) y un aumento consistente en especies reactivas propias de procesos inflamatorios (Barros de Oliveira *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2013; Cuzzocrea *et al.*, 2019).

Estas especies reactivas son moléculas o fragmentos moleculares, con electrones no apareados en el orbital externo que tienden a iniciar reacciones en cadena que resultan en la alteración química irreversible de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Éstas son parte de diversos procesos biológicos y se producen dentro de la célula en situaciones controladas. Bajo condiciones particulares, la producción excesiva o la eliminación limitada de especies reactivas, inducen varios de los síntomas observados durante el progreso de ciertas enfermedades, principalmente en aquellas que cursan con estrés oxidante e inflamación, con implicación en procesos

de apoptosis celular, en particular ocurren durante el daño y la perpetuación de la artritis reumatoide (García-Gonzales *et al.*, 2009).

Es por ello, que, en años recientes, se realizan investigaciones para elucidar la influencia de radicales libres en procesos inflamatorios durante el curso de la artritis. Se han utilizado modelos animales para el estudio de artritis experimental, con el propósito de fundamentar nuevos tratamientos e identificar posibles nuevos agentes terapéuticos para la artritis reumatoide, ya que estos modelos animales comparten algunas características con la artritis reumatoide humana. Es importante seleccionar un modelo animal que tenga una patología y/o patogénesis similar a la artritis reumatoide humana, que sea reproducible tanto en mecanismos como en resultados y que tenga la capacidad de predecir la eficacia de un agente terapéutico dado en humanos (Hegen *et al.*, 2007). Para esto, se han establecido modelos que cumplen con lo anterior, como el modelo de artritis en ratas, inducida por adyuvante incompleto de Freund (AIF) y la artritis inducida por colágeno de pollo tipo II(CIA), en los que se desencadena una respuesta inflamatoria de patología similar y que han sido utilizado para probar agentes terapéuticos, algunos de ellos son compuestos de origen vegetal (Ellis, 1992; García-Gonzales *et al.*, 2009).

Diversos extractos de plantas y compuestos derivados de éstos, han sido estudiados por su efecto antiinflamatorio, observando que tienen un efecto sobre la reducción del daño patológico producido por la artritis reumatoide. El licopeno, extraído de frutos de jitomate, administrado en una dosis de 40 mg/día por 2 semanas, o bien el  $\beta$ -caroteno (22.3 mg/día por 4 semanas), el  $\alpha$ -caroteno (15.7 mg/día por 4 semanas) y la luteína (11.3/día mg por 8 semanas), han demostrado ejercer un efecto antioxidante y antiinflamatorio, en personas adultas de 20 a 70 años, utilizando el modelo de linfocitos de sangre periférica reduciendo el daño del ADN por peróxido de hidrógeno (Pool-Zobel *et al.*, 1997). Se ha comprobado el efecto antiinflamatorio del compuesto esquisandrín, derivado de *Schisandra chinensis*, administrando 100 mg/kg, utilizando el modelo de edema de pata inducido por carragenina en ratonas, mostrando una reducción del estrés oxidante y la función de marcadores inflamatorios como NO, COX-2, PG2 y NF-kB (Guo *et al.*, 2008). Además, los frutos de aguacate (*Persea americana*) han sido reportados con actividad antiinflamatoria, debido al contenido de ácidos grasos y carotenoides, con una reducción de IL-6 y NF-kB, en un modelo de células mononucleares de sangre periférica (Li *et al.*, 2013).

El aceite de los frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), ha sido utilizado en la medicina tradicional de México (Gioanetto y Blas, 2000; Bello-González, 2006), pero son pocos los estudios encaminados a la determinación de algunas de sus propiedades medicinales. Aunque en nuestro grupo de trabajo se ha descrito que extractos lipídicos de semilla de esta variedad de aguacate, modulan la respuesta inflamatoria *in vitro*, disminuyendo la expresión de las citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$  (Báez-Magaña, 2014; Lara-Márquez *et al.*, 2018), no se han realizado estudios con el aceite obtenido de la semilla de esta variedad,

dirigidos a determinar la actividad antioxidante y su relación con las propiedades antiinflamatorias *in vivo* y su relación con el efecto antiartrítico.

Por lo anterior y debido a que el aceite y la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano, muestran una alta actividad antioxidante y antiinflamatoria (Capítulos I y II), en la presente investigación se determinó el efecto antiartrítico en ratas Wistar macho artríticas, utilizando el modelo experimental de artritis inducida por adyuvante incompleto de Freund y por colágeno II.

## Material biológico

**Semillas de aguacate nativo mexicano.** Los frutos fueron colectados en los meses de mayo a agosto de 2018, en plantas cultivadas en huertos de la región de Tingambato, Michoacán, México (19°30'6" Norte, 101°51'14" Oeste). Las semillas fueron separadas de los frutos y almacenadas en congelación (-20°C) hasta su uso.

**Animales.** Se utilizaron ratas Macho Wistar (*Rattus norvegicus*), de 3 meses de edad de 400 g, mantenidas bajo condiciones de ciclos de luz de 12 h, en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, según las recomendaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio).

## Obtención del aceite y las fracciones

El aceite de semilla se obtuvo por el método Soxhlet, utilizando 100 g de semilla pulverizada en nitrógeno líquido, por cada reflujo de hexano se usaron 1000 mL durante 6 h. La fracción metanólica se obtuvo por separación líquido-líquido en embudo de separación, utilizando partes iguales de hexano y metanol, y repitiendo el proceso tres veces.

## Establecimiento del método experimental de artritis reumatoide

La artritis reumatoide se estableció en ratas Wistar macho, mediante adyuvante incompleto de Freund (AIF) e inducida por colágeno tipo II según Song *et al.*, 2015 (CIA) (Hegen *et al.*, 2007; García-Gonzales *et al.*, 2009; Song, *et al.*, 2015; Nobuo, *et al.*, 2016).

**Colágeno.** El colágeno (C9301 Sigma-Aldrich Collagen from chicken sternal cartilage Type II, Miller), se disolvió a 2 mg/mL en ácido acético 0.05 M con agitación suave durante la noche a 4° C, la cual se mantuvo a 4° C hasta su uso.

**Preparación de la emulsión.** En un volumen de 2.5 mL de AIF (F5506 Sigma-Aldrich Freund's Adjuvant, Incomplete) mantenido en agitación, se agregó lentamente un volumen igual de la solución de colágeno, gota a gota mientras se mezcla a baja

velocidad (1000-3000 rpm) y se procedió a un agitado vigoroso a alta velocidad durante 4 h. Se dejó en reposo durante una noche a 4° C antes de ser utilizado para la inducción.

**Método de inducción.** Para cada inducción se administró 0.1 mL de emulsión/rata vía subcutánea, con la inserción del lado biselado de la aguja hacia arriba y paralelo a la cola de la rata a 2 cm de la base (Figura 11). A los 7 días, se administró de la misma forma, 0.05 mL de la emulsión como refuerzo. La inyección de refuerzo fue administrada en un lugar diferente de la inyección inicial, para evitar mayor daño.

**Evaluación de la inducción de artritis.** La inducción de la artritis se evaluó de manera cualitativa según el índice de puntuación en los parámetros establecidos por el fabricante del AIF y CIA (Cuadro 6). La inflamación se midió en el tamaño del diámetro (mm) en las extremidades posteriores.



**Figura 11.** Fotografía donde se muestra la forma de administración de la emulsión para la inducción de artritis, en la cola de la rata, a 2 cm de la base.

**Cuadro 6.** Índice de niveles artríticos (Zhang *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015).

Índice de Puntuación	Parámetros
0	Sin inflamación.
1	Enrojecimiento e hinchazón leves pero definidos del tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados.
2	Enrojecimiento moderado e hinchazón de tobillo o muñeca.
3	Enrojecimiento intenso e hinchazón de toda la pata, incluidos los dedos.
4	Miembro con inflamación máxima con afectación de múltiples articulaciones.

## **Efecto antiartrítico del aceite de aguacate y de la fracción metanólica**

**Forma de administración.** Los ensayos fueron realizados con la administración oral de 50  $\mu$ L del aceite (Aceite de aguacate-AR) y la fracción metanólica (Fracción metanólica-AR), en una dosis (1 mg/kg de rata) durante 28 días. El aceite fue disuelto en aceite mineral y la fracción metanólica en dimetilsulfóxido (DMSO 5%).

Como tratamientos controles, se usaron los siguientes: Control de artritis sin tratamiento (AR), control de artritis con administración de Dexketoprofeno (DKE-AR) 0.1 mg/kg, control de artritis con administración de Dexometasona (DEX-AR) 0.01 mg/kg y control sin artritis (NO-AR).

**Química sanguínea y estudio inmunológico.** Después de la eutanasia, la sangre fue colocada en tubos BD Vacutainer, dejando coagular para posteriormente obtener el suero con centrifugación a 3,500 rpm/10 min. El suero fue analizado mediante pruebas de química sanguínea (glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos) a través del equipo Dri-Chem NX500i Fujifilm e inmunológicas como el factor reumatoide (FR) y proteína C reactiva por aglutinación en placa. Para el FR se utilizó el anticuerpo IgG (Fracción Fc) y para la proteína C, el anticuerpo IgG de cabra.

## **Resultados y discusión**

### **Establecimiento de la artritis**

En la presente investigación se evaluó la actividad antiartrítica en un modelo experimental de rata, tanto del aceite como de la fracción metanólica de semillas de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) en una dosis oral de 50  $\mu$ L por 28 días, a la concentración de 1 mg/mL, ya que ésta mostró una alta actividad antioxidante y antiinflamatoria (Capítulos I y II).

El método de establecimiento de artritis se obtuvo de manera óptima, ya que después de la administración de la emulsión del AIF y CIA, a los 7 días se presentó una respuesta inflamatoria en la parte del tobillo de la rata y un enrojecimiento y pérdida de la función motriz de la pata en etapas más avanzadas (14 días), demostrándose la inducción de la artritis, sobre todo en las extremidades posteriores, con registros de índice de 2 (Cuadro 7). A este tiempo, se inició la administración oral del aceite y fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano, así como de los tratamientos control, con registros posteriores de los parámetros del cuadro 1.

La artritis reumatoide está asociada con trastornos inflamatorios sistémicos que involucran múltiples articulaciones. Un trastorno autoinmune de generación desconocida se caracteriza por la destrucción progresiva de las articulaciones, deformidad, discapacidad y muerte prematura en la mayoría de los pacientes (Lee *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013).

**Cuadro 7.** Índices de artritis durante el establecimiento y tratamiento con el aceite y la fracción metanólica de semillas de aguacate nativo mexicano.

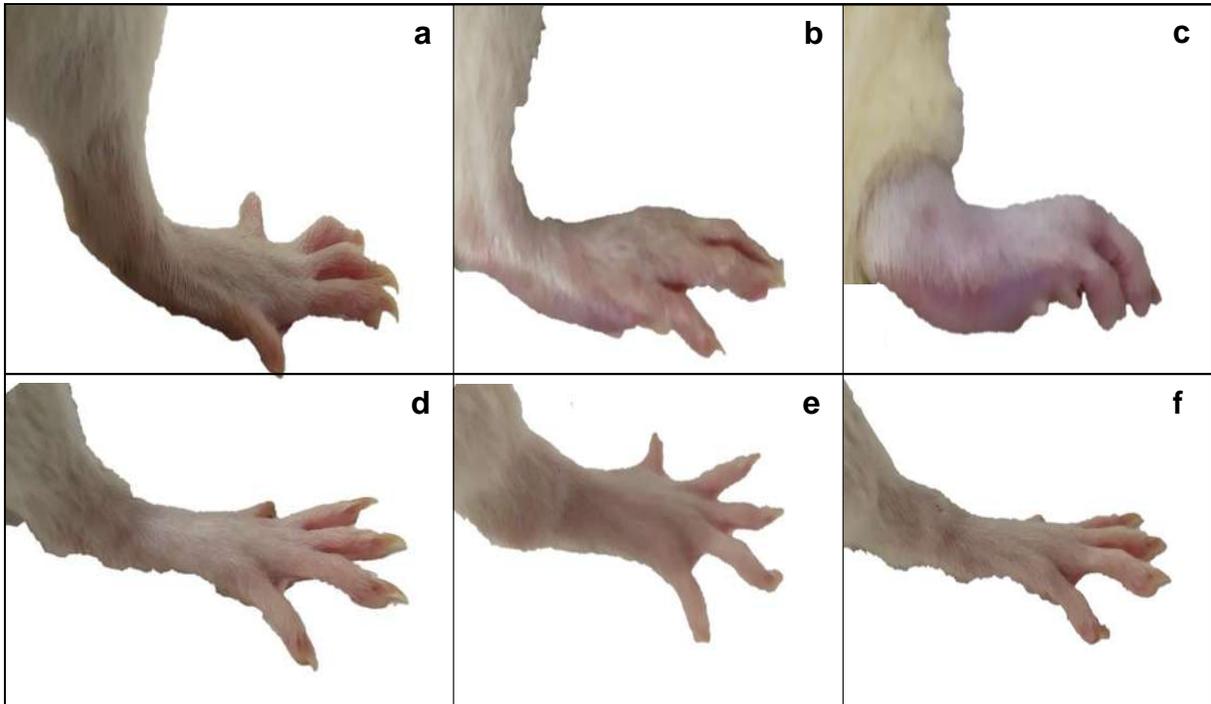
Tratamiento	Índice Artrítico			
	Días			
	1	10	18	28
<b>NO-AR</b>	0	0	0	0
<b>AR</b>	2	3	4	4
<b>Aceite de aguacate-AR</b>	2	2	2	2
<b>Fracción metanólica-AR</b>	2	2	2	3
<b>DKE-AR</b>	2	2	3	4
<b>DEX-AR</b>	2	1	1	2

Los resultados de la presente investigación, indican un efecto antiinflamatorio dependiente del tratamiento y del tiempo de administración del mismo, ya que se observó que la dosis del aceite de aguacate y de la fracción metanólica presentaron una mayor actividad antiinflamatoria que el control de artritis sin tratamiento (AR), ya que a partir del día 10, ambos fueron determinantes en la disminución del edema en la pata, con valores de  $5.89\text{mm} \pm 0.01$  y  $6.87\text{mm} \pm 0.23$ , respectivamente, relacionados con la alta inflamación que se mantuvo en las ratas control AR, con  $8.4\text{mm} \pm 2.26$ .

Este efecto se mantuvo a los 18 días y 28 días, permaneciendo el efecto antiinflamatorio ejercidos por el aceite y la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano, ya que el registro de inflamación final en las ratas control AR, fue de  $8\text{mm} \pm 0.40$ . Se observó que la inflamación fue mitigada por el DEX-AR con  $6.23\text{ mm} \pm 0.15$  siendo el mejor en la reducción de los síntomas de Artritis al final del tratamiento, mientras que DKE-AR  $6.23\text{ mm} \pm 2.65$  pero dependiendo de la sensibilidad de la respuesta al tratamiento. En cuanto a los valores del índice artrítico, al tiempo inicial de inducción de la artritis (0 días), éste fue considerado 0, ya que el diámetro de la pata de la extremidad en experimentación sin inflamación fue de  $6.73\text{ mm} \pm 0.05$ , valor estandarizado para todas las ratas de los diferentes grupos del modelo experimental (Figura 12a).

Al día 1, de aparición de los síntomas de la artritis reumatoide, en todos los grupos se registró un índice artrítico de 2, ya que se presentó enrojecimiento e inflamación leve ( $7.31\text{ mm} \pm 0.23$ ) (Figura 12b) y a partir de este día, principalmente las ratas control AR mostraron todos los síntomas de acuerdo a lo reportado por Zhang *et al.* (2014) y Song *et al.* (2015), con un índice artrítico de 3 a los 10 días y de 4 a partir de los 18 días. A este tiempo, ambas extremidades mostraron afectación de inflamación máxima en todas las articulaciones (Figura 12c).

Sin embargo, las extremidades de las ratas artríticas tratadas con el aceite de aguacate nativo mexicano (Figura 12d) y con la fracción metanólica (Figura 12e), solo mostraron un índice artrítico máximo de 2, prevaleciendo inflamación solo en la articulación principal, pero sin síntomas en las demás. Este mismo efecto fue observado en las ratas a las que se les administró DEX (Figura 12f).



**Figura 12.** Fotografías representativas de signos desde el inicio de la inducción de la artritis reumatoide experimental en ratas Wistar macho, hasta la máxima inflamación y síntomas representativos de la enfermedad: a) Pata de rata sin tratamiento (tiempo 0); b) Pata de rata con un índice artrítico 2; c) Pata de rata del grupo AR con un índice artrítico 4, a los 28 días del tratamiento; d) Pata de rata del grupo tratado con aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, con un índice artrítico de 2, a los 28 días del tratamiento; e) Pata de rata del grupo tratado con la fracción metanólica del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, con un índice artrítico de 2, a los 28 días del tratamiento; f) Pata de rata con un índice artrítico de 2, del grupo tratado con dexametasona (DEX).

Se sabe que diversos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos han sido probados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónico degenerativas, tal es el caso de la artritis, donde algunos de los más recomendados son la DEX (Fogel

*et al.*, 2015) como tratamiento esteroideo y el DKE como no esteroideo (Gaskell *et al.*, 2017). El aceite de aguacate presentó mejor respuesta antiinflamatoria a lo largo de todo el tratamiento que en las ratas tratadas con DKE, pero similar a lo presentado en ratas tratadas con DEX. De manera similar al efecto del aceite, la fracción metanólica presentó una mejor respuesta antiinflamatoria que el DKE, aunque menor que la presentada en las ratas artríticas tratadas con DEX.

La artritis reumatoide está estrechamente relacionada con trastornos inflamatorios sistémicos que involucran múltiples articulaciones, por lo que es de gran importancia contener y reducir dichos trastornos (Lee *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). Es por ello, que el efecto antiartrítico mostrado por los tratamientos con el aceite y fracción metanólica del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, es positivo ya que no se observó un aumento de los signos artríticos, deteniendo el progreso de la artritis reumatoide, permitiendo la movilidad de las articulaciones dañadas y reduciendo considerablemente la inflamación. Las ratas tratadas con DEX, inhibió el progreso de la inflamación en las articulaciones y permitió la continua movilidad de las extremidades.

Los antiinflamatorios utilizados para tratar diversas enfermedades que cursan con inflamación crónica, suelen presentar efectos secundarios no deseables, por lo cual su utilización se ve reducida a un tiempo corto para esteroideos y con mayor tolerancia para no esteroideos (Fogel *et al.*, 2015; Gaskell *et al.*, 2017). Es importante mencionar que el tratamiento con aceite de aguacate nativo o con la fracción metanólica, no mostraron efectos secundarios evidentes durante la experimentación, aunque las ratas tratadas con DEX, mostraron arritmia cardiaca e insuficiencia respiratoria y posible daño renal.

Con el propósito de determinar los posibles efectos de estos tratamientos en ratas artríticas, sobre riñón e hígado, así como sobre el sistema inmune, se determinaron marcadores bioquímicos en suero, el factor reumatoide (FR) y la proteína C reactiva.

### **Efecto en marcadores bioquímicos e inmunológicos**

Se determinaron cambios en marcadores tanto bioquímicos (química sanguínea) con inmunológicos (FR y proteína C reactiva), se determinaron en suero de las ratas de cada uno de los grupos, con el propósito de relacionar sus niveles con el curso de la enfermedad y su modulación por el efecto tanto del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano como de la fracción metanólica.

Los valores de glucosa y urea, aunque variaron dependiendo de los tratamientos, éstos están dentro de las cifras de referencia para rata, según lo establecido por León y Blanco (2011), que reporta niveles normales de 43-157.2 mg/dL de glucosa y 38-63.3 mg/dL de urea. Sin embargo, el contenido de ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos, fueron más altos y por arriba de los límites de referencia, en las ratas artríticas sin tratamiento (AR) y en las tratadas con DKE-AR y DEX-AR, a excepción

de los niveles de triacilglicéridos, los que solo se ven aumentados en el grupo de ratas AR (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Marcadores bioquímicos e inmunológicos en suero de ratas Wistar macho artríticas, tratadas con el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y la fracción metanólica.

GRUPO EXPERIMENTAL	MARCADORES EN SUERO							
	Glucosa <sup>1</sup>	Urea <sup>1</sup>	Ác. úrico <sup>1</sup>	Creatinina <sup>1</sup>	Colesterol total <sup>1</sup>	Triacil-glicéridos <sup>1</sup>	FR <sup>2</sup>	Proteína C <sup>3</sup>
NO-AR	68.1 ± 4.5 <sup>a</sup>	38.33 ± 5.2 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.05 <sup>a</sup>	61.59 ± 5.1 <sup>a</sup>	62.63 ± 7.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.11 <sup>a</sup>
AR	98.3 ± 10.1 <sup>b</sup>	44.56 ± 3.7 <sup>b</sup>	2.02 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.9 <sup>d</sup>	132.51 ± 9.7 <sup>c</sup>	103.95 ± 10.1 <sup>c</sup>	6.6 ± 0.5 <sup>d</sup>	5.5 ± 0.5 <sup>e</sup>
Aceite de aguacate-AR	71.9 ± 5.6 <sup>a</sup>	39.87 ± 5.2 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.09 <sup>b</sup>	76.5 ± 6.9 <sup>b</sup>	59.06 ± 6.7 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
Fracción metanólica-AR	72.1 ± 5.6 <sup>a</sup>	41.63 ± 5.7 <sup>ab</sup>	1.53 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.7 <sup>b</sup>	75.91 ± 8.1 <sup>b</sup>	67.41 ± 7.1 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.18 <sup>c</sup>
DKE-AR	102.2 ± 9.9 <sup>b</sup>	40.42 ± 4.7 <sup>ab</sup>	2.01 ± 0.99 <sup>c</sup>	0.82 ± 0.07 <sup>c</sup>	127.9 ± 10.1 <sup>c</sup>	73.86 ± 8.3 <sup>ab</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.8 ± 0.14 <sup>d</sup>
DEX-AR	124.61 ± 7.2 <sup>c</sup>	45.35 ± 3.1 <sup>c</sup>	2.04 ± 0.19 <sup>d</sup>	1.09 ± 0.11 <sup>d</sup>	128.6 ± 9.8 <sup>c</sup>	86.78 ± 6.1 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.7 ± 0.11 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>mg/dL; <sup>2</sup>UI/mL; <sup>3</sup>mg/L; Letras distintas muestran diferencias significativas (p≤0.05, n=5, prueba de Tukey).

En cuanto a los niveles del FR y la proteína C reactiva, éstos solo se observaron elevados, en el límite considerado para artritis reumatoide establecida (>5 Unidades Internacionales (UI)/mL, en las ratas artríticas sin tratamiento.

Lo anterior sugiere que los niveles normales de glucosa mantienen el funcionamiento correcto del páncreas sin daños a éste; los niveles altos de ácido úrico podrían indicar fallas de funcionamiento renal, ya que éste también puede acumularse en el articulaciones y tendones, generando inflamación y daño en el área, lo cual es contraproducente en el curso de la AR. El aceite de aguacate y la fracción metanólica presentan un potencial como alternativa en el inicio o progreso de la enfermedad, ya que evitan el aumento de éste y mantienen niveles permisibles, a comparación de los grupos tratados con antiinflamatorios.

A niveles altos de ácido úrico se pueden presentar niveles altos de creatinina, lo cual puede indicar posible daño celular, daño en riñones debido a la falta de capacidad de eliminación de éstos, el nivel de creatinina se ve controlado con la administración del aceite de aguacate y la fracción metanólica lo cual podría indicar protección ante el

daño, de caso contrario los antiinflamatorios utilizados no disminuyeron dichos niveles. La disminución de niveles de colesterol y triacilglicéridos puede disminuir los síntomas generados por la AR ya que se sabe sobre la relación entre niveles altos de colesterol y riesgo mayor a largo plazo de desarrollar AR y aumentar los síntomas de ésta en mujeres, pero no en hombres.

El índice de proteína C señala procesos inflamatorios los cuales se ven controlados tanto con el aceite de aguacate, fracción metanólica y antiinflamatorios, con una disminución menor para los dos primeros, lo cual indica un control mayor de los procesos inflamatorios generados por al AR (Mendoza *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2015; Turesson *et al.*, 2015). Estos efectos se podrían atribuir a los ácidos grasos de cadena larga como ácido palmítico, oleico, linoleico, ácidos grasos polihidroxiados, persina y ácido behénico, pertenecientes al aceite de semilla de aguacate nativo mexicano.

## Conclusión

El aceite de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) presentó la mayor actividad antiinflamatoria y antiartrítica administrada de manera oral en modelo *in vivo* de rata, de manera similar la fracción metanólica, que mantuvo niveles antiinflamatorios y antiartríticos controlados, sin un aumento de inflamación durante el tratamiento.

Así mismo, durante el tratamiento de ratas artríticas, los marcadores bioquímicos en suero se mantuvieron sin cambios cuando se administró el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y la fracción metanólica, los que se vieron afectados durante la artritis en ratas no tratadas o a las que se les suministró dexametasona y dexketoprofeno. El factor reumatoide y la proteína C reactiva se vieron aumentados solo en ratas artríticas sin tratamiento.

## Referencias

- Báez-Magaña, M. (2014).** Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. *Tesis de Maestría en Ciencias en Biol. Exp., IIQB-UMSNH*, 83p.
- Barros de Oliveira, M., Kimiko, S., Machado, I., Roberto, G. & Salomao, R. (2011).** Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol*, 61(2):137-142.
- Bello-González, G.M.A. (2006).** Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.
- Chen, L., Qi, H., Jiang, D., Wang, R., Chen, A., Yan, Z. & Xiao, J., (2013).** The new use of an ancient remedy: a double-blinded randomized study on the treatment of rheumatoid arthritis. *American Journal of Chinese Medicine*, 41(1)263–80.

- Cuzzocrea, S., Sautenbin, L., De Sarro, G., Costantino, G., Rombolá, L., Mazzon, E., Ialenti, A., De Sarro, A., Ciliberto, G., Di Rosa, M., Caputi, A. & Thiemermann, C.** (2019). Role of IL-6 in the Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. *J Immunol*, 163(1999):5094-104.
- Díaz-Rojas, J. A., Dávila-Ramírez, F. A., Quintana-López, G., Aristizábal-Gutiérrez, F., & Brown, P.** (2016). Prevalencia de artritis reumatoide en Colombia: una aproximación basada en la carga de la enfermedad durante el año 2005. *Revista Colombiana de Reumatología*, 23(1), 11–6.
- Ellis, J. S., chain, b. M., cooke, A., Ibrahim, M. A., & Katz, D. R.** (1992). Adjuvant composition determines the induction of type II collagen-induced arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 36(1):49–56.
- Fogel, I., Amir, J., Bar-On, E., & Harel, L.** (2015). Dexamethasone therapy for septic arthritis in children. *pediatrics*, 136(4):e776–e782.
- García-González, A. L., Martín & Ochoa, L.** (2009). Anti-inflammatory activity of superoxide dismutase obtained from *Debaryomyces hansenii* on type II collagen induced arthritis in rats. *Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 61(3):212-20.
- Gaskell, H., Derry, S., Wiffen, P. J., & Moore, R. A.** (2017). Single dose oral ketoprofen or dexketoprofen for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5(CD007355):1-103.
- Gioanetto, F. & Blas, M.** (2000). Etnobotánica de la meseta P'urepecha, CRIC, Roma.
- Guo, L., Manh, T., Hwan, K., Myoung, E., Yu, H., Na, Y., Sik, Sam., Pyo, H. & Shik, Y.** (2008). Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *European Journal of Pharmacology*, 591(2008):293–9.
- Hegen, M., Keith, J. C., Collins, M., & Nickerson-Nutter, C. L.** (2007). Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, 67(11):1505–15.
- Huang, S. S., Chiu, C. S., Chen, H. J., Hou, W. C., Sheu, M. J., Lin, Y. C., & Huang, G. J.** (2011). Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-inflammation of asiatic acid in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(1):1–10.
- Hussein, S. Z., Yusoff, K., Makpol, S., & Yusof, Y.A.** (2013) Gelam honey attenuates carrageenan-Induced rat paw inflammation via NF-kB pathway. *PLoS ONE*, 8(8):e72365.
- Kuskoski, E.M, Asuero, A.G, Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. & Fett R.** (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4):726-32.
- Lara-Márquez, M., Spagnuolo, A, P., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A. & Lopez-Meza, J. E.** (2018). Cytotoxic mechanism of long-chain lipids extracted from mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on colon cancer cells. **Experimental Biology Annual Meeting**, American Societies for Experimental Biology **(EB2018)** Meeting, American Societies for Experimental Biology Meeting **ASBMB**. San Diego, California. 21-25 de abril de 2018.
- Lee, J.S., Kim, K.A., Jeong, S.H., Lee, S.G., Park, H.J., Kim, N.J. & Lim, S.,** (2009). Antiinflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of *Alpinia officinarum* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 126(1):258–64.
- Lee, M.Y., Park, B.Y., Kwon, O.K., Yuk, J.E., Oh, S.R., Kim, H.S., & Ahn, K.S.** (2009). Anti-inflammatory activity of (-)-aptosimon isolated from *Daphne genkwa* in RAW264.7 cells. *International Immunopharmacology*, 9(7-8):878–885.

- León, G.A.C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B.O., Arteaga M.E., Bada A.M., González Y. & Mancebo A.** (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12(11):1-10.
- Li, Z., Wong, A., M.Henning, S., Zhang, Y., Jones, A., Zerlin, A., Thamen, G., Bowerman, S., Tseng, C. & Heber, D.** (2013). Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. *Food Funct*, 4:(2013):384.
- Mendoza VG., Rocha-Muñoz DA, Guerra-Soto JA., Ramirez-Villafaña M., Gonzalez-Sanchez, AG., Gamaz-Nava, JI. & Nava A.** (2013) Artritis reumatoide y dislipidemias. *El residente*, 8(1):12-22.
- Moon,J.K. & Shibamoto, T.** (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.*, 57(2):1655-1666.
- Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski I, & Rechkemmer G.** (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(1):1847–50.
- Prada, H.D., Hernández, T.C., Gómez, M.J., Gil, A.R., Reyes, P.Y., & Solís, C.U.** (2015). Evaluación de la calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con artritis reumatoide en el Centro de Reumatología. *Rev Cuba Reumatol*, 17(1):48-60.
- Saavedra. M-A., Sanchez, A., Bustamante, Reyna., Miranda-Hernandez, D., Soliz-Antezana, J., Cuz-Dominguez, P., Morales, S., & Jara, LJ.** (2015). Desenlace materno-fetal en mujeres mexicanas con artritis reumatoide. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*,b 53 (Supl1):S24-9
- Song, H.P., Li, X., Yu, R., Zeng, G., Yuan, Z.Y., Wang, W., & Cai, X.** (2015). Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4):1483–88.
- Turesson, C., Bergström, U., Pikwer, M., Nilsson, J.-Å., & Jacobsson, L. T.** (2015). High serum cholesterol predicts rheumatoid arthritis in women, but not in men: a prospective study. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1):1-9.
- Uotsu, N., Shen, M., Yazawa, K., & Teramoto, S.** (2016). Suppression of Arthritis Progression with Lutein Extracted from *Tagetes erecta* in Collagen-Induced Arthritis Model Rats. *Immunology Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 16(2):134–141.
- Zhang, C.F., Zhang, S.L., He, X., Yang, X.L., Wu, H.T., Lin, B.Q., & Yuan, C.S.** (2014). Antioxidant effects of Genkwa flos flavonoids on Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(3):793–800.

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante con los métodos DPPH, ABTS y TAC, y se determinó el contenido total de los compuestos bioactivos (ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides) del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) y de las fracciones obtenidas (fracción metanólica y fracción clorofórmica). Además, se evaluó la actividad antiinflamatoria del aceite y la fracción metanólica, ya que éstas mostraron la mayor actividad antioxidante, utilizando el ensayo de edema en pata de rata inducido con carragenina, con la administración tópica y oral, siguiendo el método de Winter *et al.* (1968), utilizando diferentes dosis (0.1, 1 y 10 mg/kg). Para finalmente, analizar el efecto antiartrítico del aceite de aguacate y la fracción metanólica administrados de forma oral según Song *et al.* (2015), en el modelo de artritis reumatoide inducida con adyuvante incompleto de Freund y Colágeno II, administrando la dosis con mayor actividad antiinflamatoria (1 mg/kg).

### 8.1. Relación de la actividad antioxidante con el contenido de compuestos activos

Aunque la fracción metanólica demostró tener mayor capacidad antioxidante en ABTS y TAC, con valores más altos de 80% y obteniendo IC<sub>50</sub> en concentraciones bajas (0.035 mg/mL y 0.153 mg/mL, respectivamente) (Figuras 4b y 4c), el aceite de semilla de aguacate mostró la más alta actividad antioxidante por el método DPPH (Figura 4a). Esto se relaciona con el contenido y tipo de compuestos bioactivos totales encontrados, indicativo de que, en este último, la actividad se debe mayormente a compuestos de naturaleza polar o polar intermedia; en cuanto a la fracción metanólica, la actividad debe estar relacionada a que ésta contiene tanto compuestos polares, de polaridad intermedia como no polares (Kuskoski *et al.*, 2005).

Con el fin de comprobar que tipo de compuestos pudieran relacionarse con esta actividad antioxidante, al determinar el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides totales, se encontró una relación directa entre la actividad antioxidante y

el contenido de algunos de estos compuestos bioactivos. En la fracción metanólica fue más clara esta relación, ya que se obtuvieron los mayores valores para ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides totales (0.17  $\mu$ moles EAG/mg p.f., 5.49  $\mu$ moles EQ/mg p.f. y 2.35 mg EL/Kg p.f., respectivamente) (Figura 5).

En algunas investigaciones, se ha reportado que al igual que lo observado en el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, extractos hexánicos o aceites de diferentes plantas, muestran también una alta actividad atrapadora del radical DPPH, como los de semillas de *Erythrina americana* y de aceituna, siendo incluso mayor que la de extractos metanólicos (Aşık y Özkan, 2011; Ibarra-Estrada *et al.*, 2011). Es importante describir, que los aceites de diversos frutos o plantas en general, presentan alta actividad antioxidante no solo debido al contenido de compuestos lipofílicos como vitaminas y ácidos grasos, ya que además contienen compuestos de polaridad intermedia de naturaleza fenólica o terpénica, que son responsables de mostrar alta actividad antioxidante cuando se analiza por el método DPPH (Alidadi *et al.* 2017).

El porcentaje de la actividad antioxidante encontrada en la fracción metanólica (99.7%), indica que los compuestos polares separados del aceite tienen una alta capacidad de atrapar radicales. Lo anterior ha sido confirmado con estudios realizados con este tipo de fracciones de diversos extractos de plantas, sobre todo, de aquellos que contienen compuestos de naturaleza fenólica (Diem *et al.*, 2014). Sus valores de IC<sub>50</sub> concuerdan con los valores reportados para extractos vegetales considerados con una alta actividad antioxidante, como lo observado en extractos metanólicos de hojas de aceituna (Rafiee *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2013; Lainer *et al.*, 2014).

Con el propósito de relacionar estos resultados con la actividad antiinflamatoria en un modelo experimental *in vivo*, se decidió probar el efecto solamente del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de su fracción metanólica en las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg, por mostrar esta alta actividad antioxidante.

## 8.2. Relación de la actividad antioxidante con la actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria determinada con tres dosis del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y su fracción metanólica (0.1, 1 y 10 mg/kg), tanto de manera tópica como oral con un tratamiento por 28 días, mostró un óptimo efecto antiinflamatorio de ambos extractos, ya que mostraron una reducción de la inflamación desde las 4 h después de inducción del edema, provocado por carragenina. Con la aplicación tópica, a las 8 h después de la inducción de la inflamación, se obtuvo la mayor actividad antiinflamatoria tanto con el aceite como la fracción metanólica con 70.85% y 72.21%, respectivamente (Figuras 6 y 7).

Estos porcentajes de actividad antiinflamatoria son considerados como óptimos si se comparan con los resultados de otras investigaciones, ya que algunos extractos presentan similares porcentajes, pero a dosis más altas, tal es el caso de las fracciones clorofórmica y metanólica de *Moringa stenopetala* y el extracto metanólico de *Leonotis ocymifolia*, las que tienen un efecto similar, pero a dosis altas como de 400 mg/kg (Tamrat *et al.*, 2017; Alemu *et al.*, 2018).

Además, las dosis encontradas para el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y la fracción metanólica, son consideradas bajas, ya que las de los antiinflamatorios utilizados en tratamientos médicos, como la indometacina y ketoprofeno, muestran un óptimo efecto a una dosis de 10 mg/kg a las 6 h (Deliorman *et al.*, 2007; Villalobos-Osorio, 2017), La dexametasona tiene este efecto a la dosis de 1 mg/kg, también a las 6 h (Villalobos-Osorio, 2017).

Con la administración oral por 28 días tanto del aceite como de la fracción metanólica a la única dosis de 1 mg/kg, la que tuvo el mayor efecto con la aplicación tópica, se observó que el aceite tuvo una mayor actividad antiinflamatoria que la fracción metanólica (68.6% y 46.7%, respectivamente) a las 8 h después de inducir la inflamación. Estos valores fueron mayores que a lo observado con la administración de ibuprofeno (17.63%) (Figura 8). Tanto el aceite como la fracción metanólica

tuvieron un efecto alto antiinflamatorio a las 7 h después de inducir la inflamación, obteniendo porcentajes de 77.12% y 67.17%, respectivamente.

De igual manera a lo reportado para la actividad antiinflamatoria por administración tópica, los porcentajes obtenidos con el aceite y la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano con la administración oral, se consideran altos debido a que se consiguen a dosis relativamente bajas (1 mg/kg), ya que, con otros extractos de origen vegetal, este efecto se produce a concentraciones altas como 100, 200, 400 y hasta 500 mg/kg (Carvalho *et al.*, 1999).

### **8.3. Relación de actividad antiinflamatoria con el tipo de compuestos bioactivos**

Con los resultados obtenidos con la determinación de los compuestos mayoritarios por técnicas cromatográficas como HPLC o CG-EM, indican que la mayor capacidad antioxidante se puede atribuir a los ácidos fenólicos mayoritarios de la fracción metanólica y el aceite de aguacate (catequina, quercetina, epicatequina y rutina), que coincide con lo establecido por Rodríguez-Carpena *et al.* (2011) y Melgar *et al.* (2018). De igual manera, es importante señalar que los compuestos encontrados por CG-EM tanto en el aceite como en la fracción metanólica, donde los mayoritarios son compuestos hidroxilados, éstos se ha determinado que presentan capacidad antioxidante (Li *et al.*, 2013; Kaulmann, 2014).

Así mismo, los resultados de esta investigación, confirman lo reportado para la actividad antioxidante y antiinflamatoria debido a los diversos compuestos determinados de las diferentes variedades de aguacate (*P. americana*), de los que al menos 30 presentan esta capacidad, lo que se relaciona con el contenido de ácidos fenólicos y de ácidos grasos y derivados hidroxilados (Melgar *et al.*, 2018; Galvao *et al.*, 2019). Se han identificado una gran cantidad de ácidos grasos y derivados de éstos como ácido linoleico, oleico, palmítico, entre otros (Galvao *et al.*, 2019), vitaminas como A, B y D (Dreher y Davenport, 2014), carotenoides como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina y neoxantina (Yu-Ge *et al.*, 2017; Melgar *et al.*, 2018),

terpenos y derivados donde la mayoría de estos son tipos (E)-nerodilol,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -pineno, trans- $\alpha$ -bergamoteno y  $\beta$ -bisaboleno (Pino *et al.*, 2000).

También se ha revelado cuatro clases de polifenoles, sobre todo en extractos metanólicos como los monómeros de flavanol, proantocianidinas, ácidos hidroxicinámicos y glucósidos de flavonol (Pino *et al.*, 2000). Los ácidos fenólicos como ácido clorogénico, ácido p-cumaroilquínico, trímeros de procianidina, ácido clorogénico y derivados de ácido cumárico, cuatro derivados de la catequina, nueve flavonoides (quercetina, kaempferol y derivados de isorhamnetin) también han sido identificados en variedades de semillas de aguacate (Rodríguez-Carpena, *et al.*, 2011; Melgar *et al.*, 2018). Es por lo anterior, que las semillas del aguacate se pueden utilizar como un ingrediente alimentario funcional o como un aditivo antioxidante (Kosińska *et al.*, 2012).

El efecto de los ácidos fenólicos en procesos inflamatorios es muy variado, se ha comprobado que reduce la NADPH-oxidasa asociado a nitritos y nitratos, reduce los niveles de IL-6 en sangre, tienen un efecto inhibitorio de NF- $\kappa$ B y reducen los niveles IL-8, entre otros. Por otro lado, los carotenoides inhiben la activación del I $\kappa$ -B (por consecuente NF- $\kappa$ B), reducen estrés oxidativo, daño celular (como la liberación de prostaglandinas) y NrF-2.

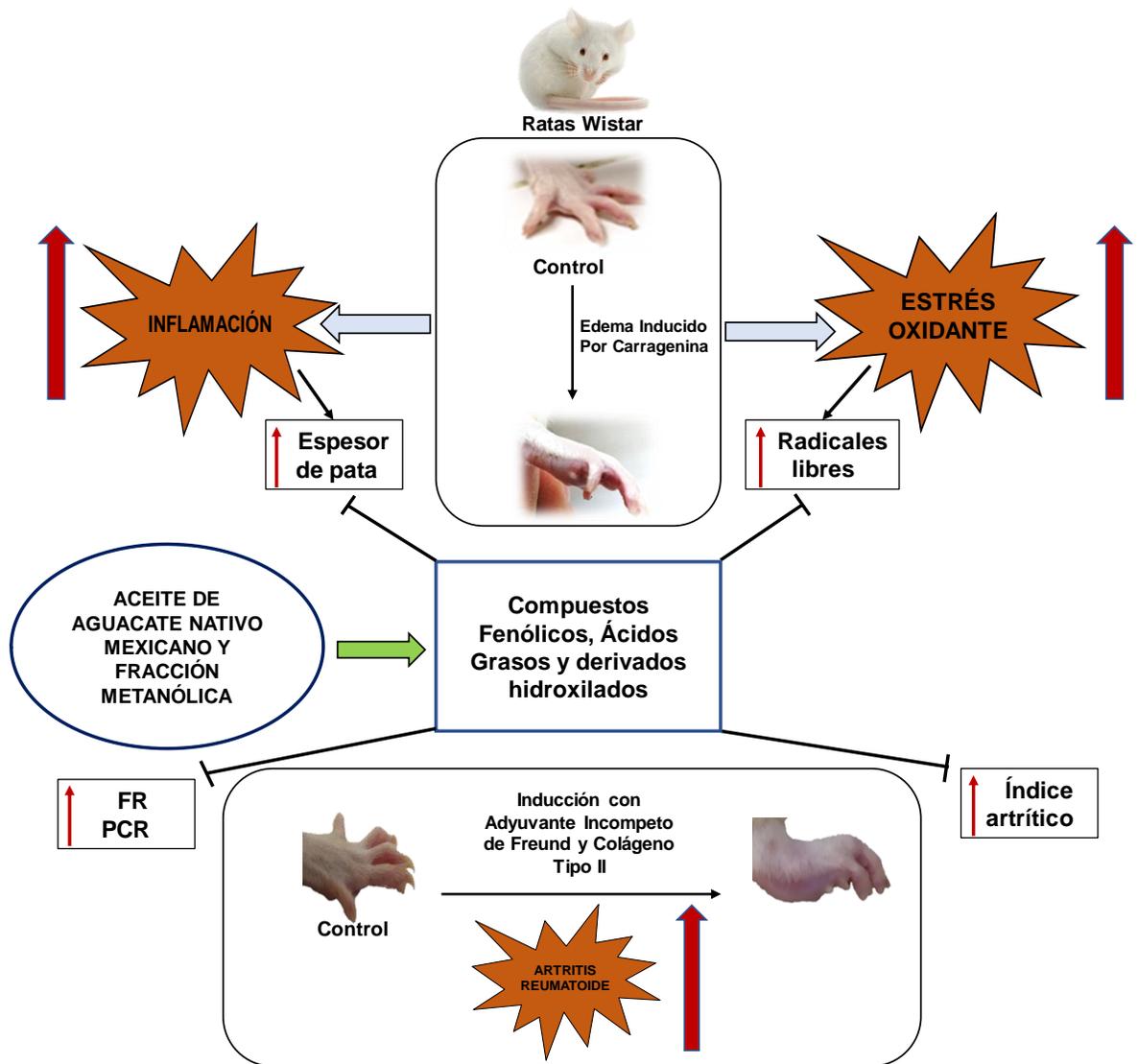
Algunos ácidos fenólicos y flavonoides, muestran actividad antiinflamatoria, solos o en combinación. En particular, el ácido gálico es un potente inhibidor de la actividad de COX-1 y COX-2 en diferentes líneas celulares, además de suprimir la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Kim *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2012). Kuppan *et al.* (2006) mostraron que el ácido gálico fue responsable de la disminución de la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en monocitos humanos (Locatelli *et al.*, 2013). Los flavonoides como las catequinas han mostrado actividad antiinflamatoria por regular la activación o desactivación de vías de estrés oxidativo relacionado con procesos de inflamación, incidiendo en la inhibición del NF- $\kappa$ B, de MAP cinasas y del factor de transcripción nuclear tipo eritroide 2 (Nrf2). La catequina sola y en conjunto con otras como la epicatequina, epicatequín galato y epigalocatequina, presentan una

marcada actividad inmunomoduladora por la regulación de citocinas proinflamatorias, reducción de la producción de EROS y de la migración de neutrófilos (Fan *et al.*, 2017).

Los ácidos grasos monoinsaturados pueden prevenir la inflamación reduciendo niveles de NF-kB, al igual que los derivados hidroxilados de ácidos grasos, que previenen daño por estrés oxidativo y en ensayos con cultivos de células de epitelio bovino, se demostró que éstos intervienen en la inhibición de TNF- $\alpha$ , IL-1B, COX-2 e iNOS. En pruebas de condrocitos bajo cultivo, se observó que éstos participan en la supresión de la síntesis de PGE2 y NO (Cuzzocrea *et al.*, 2019; Konigsber, 2007; Huang *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Kaulmann, 2014).

La actividad antiinflamatoria que fue mostrada tanto por el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano como por la fracción metanólica, con la administración tópica y oral, podría deberse al contenido de los principales compuestos fenólicos, ácidos grasos y sus derivados hidroxilados, identificados por HPLC y CG-EM, los que han sido reportado que intervienen en la regulación de procesos inflamatorios, inhibiendo la producción de leucotrieno, de prostaglandinas, de enzimas como la COX-2 y principalmente los mediadores proinflamatorios como el FN-kB, TNF- $\alpha$  y las principales interleucinas como la IL-1 $\beta$ , IL6 e IL8.

Con base a los resultados obtenidos en la presente investigación, utilizando los ensayos *in vitro* y los modelos experimentales de inflamación y de artritis reumatoide, así como a los antecedentes establecidos para explicar el o los mecanismos de acción durante un proceso de inflamación, en el siguiente diagrama se esquematiza cómo podría estar interviniendo tanto el aceite como la fracción metanólica debido a los principales compuestos identificados (Figura 13). En éste también se relaciona el efecto antioxidante, así como la detención del curso de la artritis reumatoide.



**Figura 13.** Diagrama general que describe la relación entre la actividad antioxidante *in vitro*, antiinflamatoria y antiartrítica, con la aplicación del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) y la fracción metanólica obtenida de éste, debido a los principales compuestos identificados. FR, factor reumatoide; PCR, proteína C reactiva.

#### 8.4. Relación de la actividad antiinflamatoria con el efecto antiartrítico

El desarrollo y transcurso de la AR se sabe que está estrechamente relacionado con procesos inflamatorios crónicos, dichos procesos pueden ser controlados y reducidos con la utilización de diversos compuestos, como los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, ampliamente utilizados y aceptados en diversos tratamientos para esta enfermedad. Sin embargo, se sabe que diversos compuestos bioactivos pueden reducir los síntomas de la AR, reduciendo el edema generado por el daño a las articulaciones, reduciendo daño causado por procesos oxidativos o reduciendo la expresión de biomoléculas proinflamatorias y promoviendo biomoléculas antiinflamatorias. Los extractos de plantas, alimentos o productos de éstos con propiedades antioxidantes, pueden disminuir o contrarrestar los procesos antiinflamatorios que ocurren durante el desarrollo de la artritis. Diversos compuestos como los de origen fenólico, terpenos, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados tipo omega-3 tienen un efecto antiinflamatorio, a los que se les atribuye la inducción de la expresión de moléculas como las resolvinas y protectinas, que inhiben la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que al actuar como antiinflamatorios, retrasan o disminuyen los procesos de la AR (Guerra, 1997; Cerhan *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2012; Alhambra-Expósito *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos encontrados en el aceite de aguacate y la fracción metanólica, como la catequina y epicatequina, inhiben la producción de moléculas proinflamatorias como las antes señaladas (Kurbitz *et al.*, 2011), de manera similar la rutina presenta actividad antiinflamatoria en fases crónicas (Guardia *et al.*, 2001), lo cual es de mayor importancia en el curso de la artritis reumatoide, ya que podría reducir procesos inflamatorios por tiempo más prolongado.

También es importante señalar que diversos flavonoides pueden inhibir la respuesta inmunológica, reduciendo el daño causado por el sistema inmune (Guardia *et al.*, 2001). De igual manera que los ácidos fenólicos, lo que tienen diversas funciones en el transcurso de la AR, los ácidos grasos encontrados en el aceite de semilla de

aguacate y en la fracción metanólica, como diversos ácidos grasos insaturados, se han reportado que presentan capacidad antioxidante, previenen el daño al ADN e inhiben los principales procesos de la inflamación (Beeharry *et al.*, 2003).

Al utilizar compuestos de origen vegetal con una alta actividad antioxidante, éstos pueden participar como mediadores en los procesos de inflamación, disminuyendo el estrés oxidante e interviniendo en la inhibición de la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), característica del proceso inflamatorio que acompaña a la AR, además de regular los principales mecanismos moleculares básicos que se activan durante la fisiopatología de AR (Wruck *et al.*, 2011). Durante el desarrollo y prevalencia de la AR predomina la formación de ERO y ERN que conllevan al consiguiente daño celular y tisular (Paterson *et al.*, 2003).

Generando regulación en el desbalance entre las ERO y ERN, y los antioxidantes, la inflamación es disminuida o regulada por diferentes mecanismos, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos, actúan como mensajeros intracelulares para la transducción de señales del proceso inflamatorio, inhibiendo la acción del factor de transcripción NF-kB y por consiguiente la transcripción de genes que promueven la producción de citocinas como la IL-6, IL-8 y moléculas de adhesión (ICAM-1) que agudizan el proceso inflamatorio (Paterson *et al.*, 2003).

En particular, al analizar el efecto del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de la fracción metanólica de éste, la actividad antiartrítica se relaciona más directamente con la capacidad antiinflamatoria, ya que debido a los compuestos que éstos tienen, podrían estar actuando sobre los mecanismos que cursan con la inflamación, sobre todo la que ocurre durante la AR, como el desbalance redox y la generación de ERO y ERN. Si bien, tanto el aceite como la fracción metanólica retrasan los síntomas de la AR, el tratamiento con éstos pudieran ser una opción, no para su cura, pero si para mejorar la calidad de vida de los pacientes con AR, inhibiendo los procesos de inflamación vía el control del estrés oxidante.

## 9. CONCLUSIÓN GENERAL

El aceite de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) y la fracción metanólica de éste, presentaron la mayor actividad antioxidante, la cual se relacionó directamente con el contenido de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos y carotenoides.

Esta alta actividad antioxidante se relacionó con el efecto antiinflamatorio que presentaron tanto el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano como la fracción metanólica. El contenido de compuestos fenólicos y de ácidos grasos o sus derivados hidroxilados encontrados en el aceite y la fracción metanólica, podrían ser los responsables de dicha actividad, debido a que pueden funcionar como captadores de radicales libres y disminuir o inhibir el proceso inflamatorio.

Estos compuestos, al actuar como antiinflamatorios, mostraron un efecto sobre la artritis reumatoide, al reducir el daño generado por la inflamación crónica, regulando los niveles de estrés oxidante.

Durante la artritis reumatoide, se observó que con la administración del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y la fracción metanólica, se mantuvieron diversos marcadores bioquímicos (glucosa, ácido úrico, creatinina, triacilglicéridos y colesterol) e inmunológicos (factor reumatoide y proteína C reactiva), indicativo de su efecto protector en el metabolismo hepático y renal, así como la regulación del sistema inmune, conteniendo la progresión de la enfermedad.

## 10. LITERATURA GENERAL CITADA

- Adeyemi, O., Okpo, S. y Ogunti, O.** (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *Fitoterapia*, 73(5):375-80.
- Alemu, A., Tamiru W., Nedi T., & Shibeshi W.** (2018). Analgesic and anti-inflammatory effects of 80% methanol extract of *Leonotis ocymifolia* (Burm.f.) Iwarsson leaves in rodent models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018(1)1-8.
- Alhambra-Expósito, M., Arjonilla-Sampedro, M., Molina-Puerta, M., Tenorio-Jiménez, C., Manzano-García, G., Moreno-Moreno, P. & Benito-López, P.** (2013). Recomendaciones dietéticas en la artritis reumatoide. *Rev. Esp. Nutr. Hum. Diet.*, 17(4):165-171.
- Alidadi, S., Taghi M.M., Asadi-Samani, M., & Lorigooini, Z.** (2017). Antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts and fractions of *Pistacia atlantica*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(4):293-297.
- Aşık, H.U. y Özkan, G.** (2011) Physical, chemical and antioxidant properties of Olive Oil extracted from Memecik Cultivar. *Academic Food Journal*, 9(2):13-18.
- Báez-Magaña, M.** (2014). Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. *Tesis de Maestría en Ciencias en Biol. Exp., IIQB-UMSNH*, 83 p.
- Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., & López-Meza, J. E.** (2019). Lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Immunology Research*, 2019(4):1-10.
- Barbosa-Martín, E., Chel-Guerrero, L., González-Mondragón, E., & Betancur-Ancona, D.** (2016). Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. *Food and Bioproducts Processing*, 100(1):457-463.
- Bedón, E.J.** (2013). Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de malva (*Malva sylvestris* L.) y aguacate (*P. americana*) en ratones (*Mus musculus*). *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador*. Tesis de Grado, 93 p.
- Beeharry, N., Lowe, J.E., Hernandez, A.R., Chambers, J.A., Fucassi, F., Cragg, P.J., & Green, I. C.** (2003). Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 530(1-2):27-33.
- Bello-González, M., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez B. & Salgado-Garciglia, R.** (2015). Plantas útiles de la comunidad indígena nuevo san juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, (39):175-215.
- Berradre, M., Arias, G., Ojeda, R., Sulbarán, V., Fernández, J. & Peña J.** (2014). Oil antioxidant activity of grape seeds *Vitis vinifera* of Tempranillo variety. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 31(3):393-406.
- Bielski, B., & Cabelli, D.** (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. *Active Oxygen in Chemistry*, 1(1):66-104.
- Caballero, E., Soto, C., Olivares, A. & Altamirano, C.** (2014). Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-Type production catalyzed by commercial immobilized lipases. *PLoS ONE*, 9(9):e107749.
- Cao, Guohua & Prior, R.** (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 44(6):1309-15.
- Carranco, M.E., Calvo, C. M. & Perez-Gil, F.R.** (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *ALAN Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 61(3):233-41

- Carvajal, Z., Nolasco, H., Aguilar, U., Melo, S., Hayward, J. & Barradas, D.** (2014). Effect of dietary intake of avocado oil and olive oil on biochemical markers of liver function in sucrose-fed rats. *BioMed Research International*, 2014(1):1-8.
- Carvalho, J. C., Sertié, J. A., Barbosa, M. V., Patrício, K. C., Caputo, L. R., Sarti, S. J. & Bastos, J. K.** (1999). Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(2):127-33.
- Castañeda, C., Manrique, M. & Ibáñez, V.** (2002). Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en animales de experimentación. *Horiz. Méd.*, 2(1/2):35-47.
- Castro-Mercado, A.** (2016). Efecto fungicida de extractos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre hongos fitopatógenos. *Tesis de Lic., Fac. de Q.F.B., UMSNH.*
- Cerhan, J., Saag, K., Merlino, L., Mikuls, T. & Criswell, L.** (2003). Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. *Am. J. Epidemiol.*, 157(4): 345-54.
- Chen, Y., Jobanputra, P., Barton, P., Bryan, S., Fry-Smith, A. & Harris, G.** (2008). Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, aldecocixib and lumiracoxib) forosteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic valuation. *Health Technol. Assess.*, 12(11):1-278.
- Choudhary, M., Kumar, V., Malhotra, H., & Singh, S.** (2015). Medicinal plants with potential anti-arthritic activity. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2):147.
- Chung, H., Sung, B., Jung, K., Zou, Y., & Yu, B.** (2006). The molecular inflammatory process in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4):572–81.
- Cuzzocrea, S., Sautenbin, L., De Sarro, G., Costantino, G., Rombolá, L., Mazzon, E., Ialenti, A., De Sarro, A., Ciliberto, G., Di Rosa, M., Caputi, A. & Thiemermann, C.** (2019). Role of IL-6 in the Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. *J Immunol*, 163(1999):5094-5104.
- Dai, L., Lamb, D., Leake, D., Kus, M., Jones, H., Morris, C., & Winyard, P.** (2000). Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Free Radical Research*, 32(6):479–486.
- David, J., Townsend, S., Sathanathan, R., Kriss, S., & Dore C.** (1999) The effect of acupuncture on patients with rheumatoid arthritis: a randomized, placebo-controlled cross-over study. *Rheumatology (Oxford)*, 138(9):864-9.
- De Oliveira, A., Franco, E., Barreto, R., Cordeiro, D., de Melo, R., de Aquino, C. & Maia, M.** (2013). Effect of semisolid formulation of *persea americana* mill. (avocado) oil on wound healing in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1)1–8.
- Di Sapio, O., Bueno, M.M., Busilacchi, H.H. & Severin, C.** (2008). Chía: importante antioxidante vegetal. *Agromensajes de la Facultad de Rosario*, 24(4):11-3.
- Diem, Q.D., Elisa, A.A., Lan, P.T.N., Huong, L.H., Edi, F.S., Ismadji, S., & Ju, Y. H.** (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *J Food Drug Anal*, 22(3):296-302.
- Domínguez, H, L., Hohlatcheff, A, A. & Montiel, H, J.** (2012). Tratamientos farmacológicos contra alternativos en el manejo de pacientes con artritis reumatoide. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, 43(2):2012
- Dreher, L. & Davenport, J.** (2014). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7):738-50
- Elejalde-Guerra, J.I.** (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Annu. Med. Interna (Madrid)*, 18(6):326-335.

- Ellis, J., Chain, B., COOKE, A., Ibrahim, M., & Kats, R.** (1992). Adjuvant composition determines the induction of type II collagen-induced arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 36(1):49–56.
- Fan, F.Y., Sang, L.X., & Jiang, M.** (2017). Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease. *Molecules*, 22(3):484.
- Fehrenbacher, J. C., Vasko, M. R., & Duarte, D. B.** (2012). Models of inflammation: carrageenan- or complete freund's adjuvant (cfa)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Current Protocols in Pharmacology*, 56(1):5.4.1–5.4.4.
- Fernández-Arquero, M. & Alonso-Orgaz S.** (2007). La inflamación y la enfermedad coronaria. In: Libro de la salud cardiovascular, Capítulo 38, pp. 343-348.
- Fink, M.** (2001). Cytopathic hypoxia. Mitochondria dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit. Care Clin.*, 17(1):219-237.
- Flores-Álvarez, L., Guzmán-Rodríguez, J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J.** (2018). PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 99(1)10–8.
- García-Gonzales, A., Lotz, M. & Ochoa, J.I.** (2009). Anti-inflammatory activity of superoxide dismutase obtained from *Debaryomyces hansenii* on type II collagen induced arthritis in rats. *Revista de Investigación Clínica*, 63(3):212-220.
- Garrote, A. & Bonet, R.** (2003). El papel de los AINE en el tratamiento analgésico. *OFFARM, España*, 22(2):56-62.
- Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W.** (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119(3097):623–626.
- Gómez, H., Gonzáles, K. & Domingo, J.** (2007). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3):182-217.
- González-Jiménez, E., Hernández-Espinosa, E., Cooper-Bribiesca, B., Núñez-Bretón, L., & Reyes-Reyes, M.** (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 18(1):16-2.
- Griffiths, K., Aggarwal, B., Singh, B., Buttar, S., Willson, D. & Meester, D.** (2016). Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. *Diseases*, 28(4): 1-15
- Grover, H., Gaba, N., Gupta, A. & Marya C.** (2011) Rheumatoid arthritis: a review and dental care considerations. *Nepal Med. Col. J.*, 13(2):74–6.
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., & Pelzer, L. E.** (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*, 56(9):683–687.
- Guerra, C.** (1997). Oxidantes-Antioxidantes en reumatología. *Revista Peruana de Reumatología*, 3(1)35-40.
- Guija-poma, E., Inocente-CFamones, M., Ponce-Pardo, J. & Zarzosa-Norabuena, E.** (2015). Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Med.* [online]., 15(1):57-60.
- Guo, L., Hung, T., Bae, K., Shin, E., Zhou, H., Hong, Y., & Kim, Y.** (2008). Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *European Journal of Pharmacology*, 591(1-3):293–9.
- Gutiérrez, L., García, J., Rincón, M., Ceballos, G., & Olivares, I.** (2015). Efecto de una dieta hipocalórica en el estrés oxidativo en sujetos obesos sin prescripción de ejercicio y antioxidantes. *Medicina Clínica*, 145(1):1–6.
- Guzmán-Rodríguez, J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A. & López-Meza, J.** (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*)

- PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82(1):620-27.
- Hegen, M., Keith, J., Collins, M., & Nickerson-Nutter, C.** (2007). Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(11):1505–1515.
- Herrera-Covarrubias, D., Coria-Avila, G., Fernández-Pomares, C., Aranda-Abreu, G., Manzo, J., & Hernández M.** (2015) La obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*, 32(4):766-76.
- Hitchon, C., & El-Gabalawy, H.** (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 6(6):265.
- Huang, S. S., Chiu, C. S., Chen, H. J., Hou, W. C., Sheu, M. J., Lin, Y. C., Huang, & G. J.** (2011). Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-inflammation of asiatic acid in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(1):1–10.
- Ibarra, E.E., Pacheco, M.S, Garcia, R.M., San Miguel R.C., Ramirez, G.V. & Soto M.H.** (2011). Antioxidant activity of *Erythrina americana* Miller Alkaloids. *Rev. Fitotec. Mex.*, 34(4):241-246.
- Imaizumi, T., Arikawa, T., Sato, T., Uesato, R., Matsumiya, T., Yoshida, H., Ueno, U., Yamasaki, T., Nakajima, T., Hirashima, M., Sakata, K., Ishibashi, Y., Tho, S., Ohyama, C., & Sotah, K.** (2008). Involvement of retinoic acid-inducible gene-I in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Journal of translational immunology*, 153(2):240–4.
- Jung, H. J., Kim, S. J., Jeon, W. K., Kim, B. C., Ahn, K., Kim, K., Kim, Y. M., Park, E. H., & Lim, C. J.** (2011). Anti-inflammatory activity of n-propyl gallate through down-regulation of NF- $\kappa$ B and JNK pathways. *Inflammation*, 34(5):352-61.
- Kaulmann, A. & Bohn, T.** (2014). Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *ScienceDirect*, 34(2014):907–29.
- Kim, K., Chung, T., Shin, H., Son, S., Park, K., Choi, J., & Chung, W.** (2010). Red ginseng saponin extract attenuates murine collagen-induced arthritis by reducing pro-inflammatory responses and matrix metalloproteinase-3 expression. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33(4):604–10.
- Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, S., Lee, S. H., Shin, H. Y., Kim, D. K., & Shin, T. Y.** (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.*, 91(1):123-31.
- Konigsbergs, F.** (2007). Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo\*. *REB*, 26(1):18-25.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., & Dykes, G.A.** (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18):4613-19.
- Kuppan, G., Balasubramanyam, J., Monickaraj, F., Srinivasan, G., Mohan, V., & Balasubramanyam, M.** (2010). Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. *Cytokine*, 49(2):229–34.
- Kurutas, E., Ciragil, P., Gul, M., & Kilinc, M.** (2005). The effects of oxidative stress in urinary tract infection. *Mediators of Inflammation*, 2005(4):242–244.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R.** (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4):726–732.

- Laincer, F., Laribia, R., Tamendjaria, A., Arrarb, L., Rovellinic P. & Venturini, S.** (2014). Olive oils from Algeria: Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities. *Grasas y aceites*, 65(1):e001.
- Lee, J., Huh, J., Jeon, G., Yang, H., Woo, H., Choi, D., & Park, D.** (2009). Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. *International Immunopharmacology*, 9(3):268–276.
- Lee, J., Khor, O., Limin, S., Zheng, Y., Fuentes, F. & Kong, A.** (2013). Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol. Therapeut.*, 137(2):153–71.
- Lee, M., Shin, B., & Ernst, E.** (2008) Acupuncture for rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 47(12):1747-53.
- Li, M., He, J., Jiang, L., Ng, E., Wang, H., Lam, F. & Shaw, P.** (2013). The anti-arthritic effects of *Aconitum vilmorinianum*, a folk herbal medicine in Southwestern China. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(1):122–27.
- Li, Z., Wong, A., Henning, S., Zhang, Y., Jones, A., Zerlin, A. & Heber, D.** (2013). Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. *Food Funct.*, 4(3):384–91.
- Lin, T., Zhong, L., & Santiago, J.** (2017). Anti-Inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1):70.
- Looney, R.** (2002). Treating human autoimmune disease by depleting B cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(10):863–866.
- López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Ibarra-Laclette, E., Guzmán-Rodríguez, J., López-Meza, J., Ochoa-Zarzosa, A. & Herrera-Estrella, L.** (2016). Transcriptome (ESTs) of native Mexican avocado fruit is dominated by stress and innate immunity genes. *Acta Horticulturae*, 1144(6):43–8.
- Maini, R. & Feldmann, M.** (2002). How does infliximab work in rheumatoid arthritis?. *Arthritis Research*, 4(Suppl 2):S22-8.
- Malysheva, O., Wahle, M., Wagner, U., Pierer, M., Arnold, S., & Hantzschel, H.** (2008) Low-dose prednisolone in rheumatoid arthritis: adverse effects of various disease modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol*, 35(6):979-85.
- Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., Khan, A.Q. & Zubair, S.** (2006). Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Clin. Chim. Acta*, 1(455):161-71.
- Matveicov, G., Kaliia, E., Levin, V., & Sanko, N.** (1994). The activity of superoxide dismutase and its isoenzymes in the immunocompetent cell of the peripheral blood in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ter-Arkh*, 66(4): 57-67.
- Medina, A., Casas, R., Tresserra, A., Ros, A., Martínez, M. & Fitó, M.** (2017). Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 83(1)114-228.
- Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., & Ferreira, I. C. R. F.** (2018). Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 111(2018)212–18.
- Nathan, C.** (1987). Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 80(6):1550–60.
- Nathan, C.** (2002). Points of control in inflammation. *Nature, PubMed*, 420(6917):846-52.

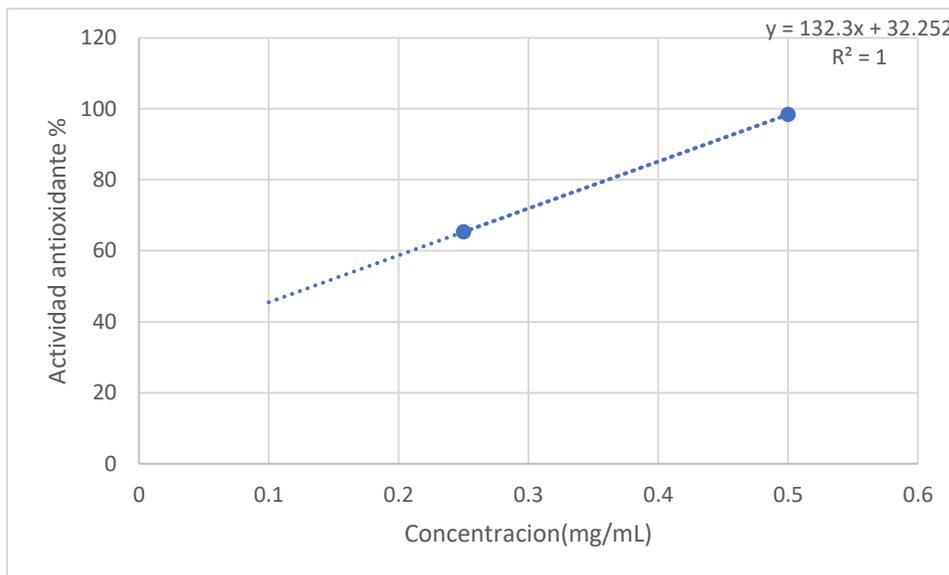
- Necas, J. & Bartosikova L.** (2013) Carrageenan: a review. *Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic Veterinarni Medicina*, 58(4):187–205
- Neeck, G.** (2002) Fifty years of experience with cortisone therapy in the study and treatment of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 966(1):28-38.
- Negrete, R.** (2011). Determinación del contenido de persina en diferentes accesiones de aguacate criollo Mexicano y evaluación de la actividad antimicrobiana. *Tesis de Maestría en Ciencias, PIMCB-UMSNH*.
- Neira, F. & Ortega, J.** (2006). Tratamiento del dolor en la artritis reumatoide fundamentado en medicina basada en la evidencia. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 13(8): 561-66.
- Ortiz-Avila, O., Gallegos-Corona, M.A., Sánchez-Briones, L.A., Calderón-Cortés, E., Montoya-Pérez, R., Rodríguez-Orozco, A.R., Campos-García, J., Saavedra-Molina, A., Mejía-Zepeda, R. & Cortés-Rojo C.** (2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 47(4):337-353.
- Padilla, F., Rincón, A. & Bou-Rached, L.** (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *ALAN*, 58(3):303-8.
- Paterson, R., Galley, H. & Webster, N.** (2003). The effect of N-acetyl cysteine on nuclear factor-kappa B activation interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit. Care Med.*, 31(11):2574-8.
- Pérez, Álvarez S., Ávila, Quezada, G. & Coto, Arbelo, O.** (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Cultivos Tropicales*, 36(2):111-23.
- Pernía, T., Corao, G. & Araujo, L.** (2004). Actividad anti-inflamatoria de la hialuronidasa por los polifenoles en la fruta de la fresa (*Fragaria vesca* L.). *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 3(4):73-6.
- Pino, J. A., Rosado, A., & Agüero, J.** (2000). *Volatile Components of Avocado (Persea americana Mill.) Fruits. Journal of Essential Oil Research*, 12(3):377–378.
- Pool-Zobel, B.** (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(9):1847–50.
- Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., & Cirino, G.** (2004). Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142(2):331–8.
- Rafiee, Z., Jafari S.M., Alami, A. y Khomeiri, M.** (2012). Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of Olive Leaves on Sunflower Oil., *J. Agr. Sci. Tech*, 14(2012):1497-509.
- Ramos-Ibarra, M., Bautista-González, C., Gómez-Meda, B. & Zamora-Pérez, A.** (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*, 7(1):7-15.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Lima, J.L., & Fernández E.** (2015). Proinflammatory pathways: The Modulation by Flavonoids. *Medicinal Research Reviews*, 35(5):877-936.
- Rodríguez-Carpenta, J. G., Morcuende, D., & Estevéz, M.** (2012). Avocado, sunflower and olive oils as replacers of pork back-fat in burger patties: effect on lipid composition, oxidative stability and quality traits. *En: Meat science*, 90(1):106-15.
- Rodríguez-Graña, T., Peña, M., Gómez, N., Santisteban, Y., & Hernández, M.** (2015). Estrés oxidativo: genética, dieta y desarrollo de enfermedades. *Correo Científico Médico de Holguín*, 16(4):690-705.
- Rosenblat, T., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A. & Zanin, Z.** (2011). Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.*, 303(4):239-46.

- Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A Review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*, 2012(10):1–15.
- Sánchez-Ramón, S., López-Longo, F., & Carreño, L. (2011). Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatología Clínica*, 6(s3):s20-4.
- Sánchez-Valle, V. & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev. Invest. Med. SurMex.*, 20(3):161-8.
- Shahidil, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18(2015)757-781.
- Song, H.P., Li, X., Yu, R., Zeng, G., Yuan, Z.Y., Wang, W., & Cai, X. (2015). Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4):1483–88.
- Stamp, L., Khalilova, I., Tarr, J., Senthilmohan, R., Turner, R., Haigh, R. & Kettle, A. (2012). Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51(10):1796–1803.
- Tamrat, Y., Nedi T., Assefa S., Teklehaymanot T. & Shibeshi W. (2017). Anti-inflammatory and analgesic activities of solvent fractions of the leaves of *Moringa stenopetala* Bak. (Moringaceae) in mice models. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17(1):473-483.
- Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A. & Salgado-Garciglia, R. (2018). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.). *Pharmacognosy Magazine*, 3(4):875–880.
- Tsegay, H. (2017). Determination of oil and biodiesel content, physicochemical properties of the oil extracted from avocado seed (*Persea americana*) grown in Wonago and Dilla (Gedeo zone), Southern Ethiopia. *Chemistry International*, 3(3):31
- Valdez, J. (2011). Determinación del contenido, variación fenológica y efecto citotóxico de persina de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Tesis de Maestría en Ciencias eb Biol. Exp., IIQB-UMSNH*.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1):44–84.
- Vane, J., & Botting, R. (1996). Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 25(sup102), 9–21.
- Vasanthi, p., Nalini, g. & Rajasekhar, g. (2009). Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 12(1):29–33.
- Vetal, S., Bodhankar, S. L., Mohan, V. & Thakurdesai, P. A. (2013). Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats. *Food Science and Human Wellness*, 2(2):59–67.
- Winter, C.A., Risley, E.A. & Nuss, G.W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111(3):544–7.
- Wruck, C., Fragoulis, A., Gurzynski, A., Brandenburg, L., Kan, Y., Chan, K., Hasenpflug, J., Freitag-Wof, S., Varoga, D., Lippross S. & Pufe, T. (2011). Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann. Rheum. Dis.*, 70(5):844-50.
- Yadegarinia, D. (2006). Biochemical activities of *iranian Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils., *Phytochemistry*, 67(12):1249–255.
- Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food. Chem.*, 49(8):4083-4089.
- Yoon, C. H., Chung, S. J., Lee, S. W., Park, Y. B., Lee, S. K., & Park, M. C. (2013). Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene

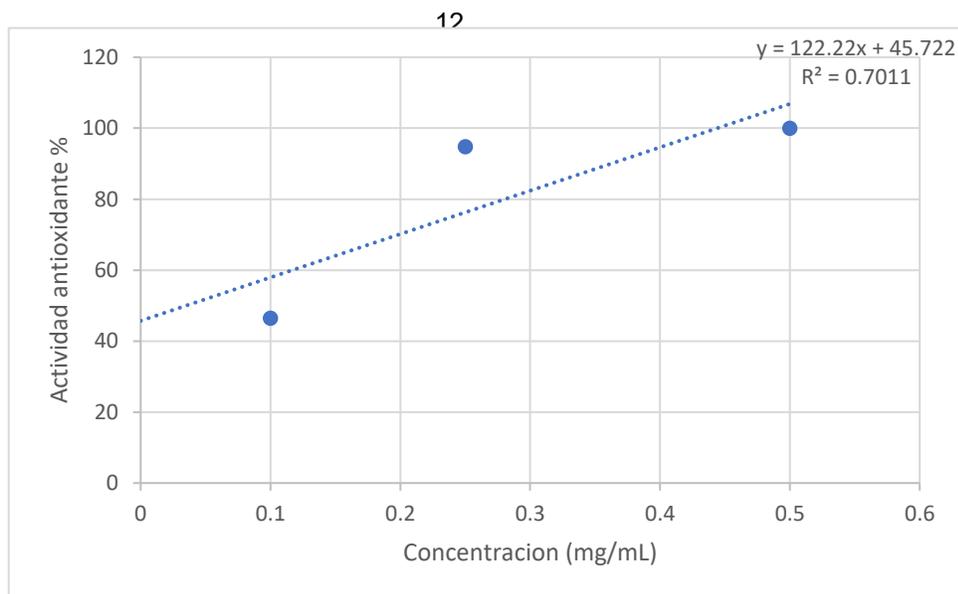
expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, 80(3):274-279.

## 11. ANEXOS

**Anexo 11.1.** Curva de calibración de IC<sub>50</sub> de la fracción metanólica del aceite de aguacate nativo mexicano, determinada por el método TAC.



**Anexo 11.2.** Curva de calibración de IC<sub>50</sub> de la fracción metanólica del aceite de aguacate nativo mexicano, determinada por el método DPPH.



**Anexo 11.3.** Curva de calibración de ácido gálico ( $\mu\text{moles/g}$  peso fresco) ( $\lambda=725$  nm) (a); curva de calibración de quercetina ( $\mu\text{moles/g}$  peso fresco) ( $\lambda=415$  nm) (b).

