



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO, VARIACIÓN
FENOLÓGICA Y EFECTO CITOTÓXICO DE PERSINA
DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO
(*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*)”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

BIÓL. JULIO VALDEZ PARTIDA

DIRECTORES DE TESIS:

**D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA
D.C. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA**

MORELIA MICHOACÁN, FEBRERO DE 2011

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología Vegetal (Instituto de Investigaciones Químico Biológicas) y de XXXXXXXXXXXX (Centro Multidisciplinario de Estudios Biotecnológicos) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y USO DE PLANTAS MEDICINALES	4
2.1.1. Fitoquímica y actividad biológica	6
2.1.2. Compuestos anticancerígenos	7
2.1.3. Acetogeninas	9
2.2. USO DE PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO	13
2.2.1. Avances en validación del conocimiento tradicional	15
2.2.2. Plantas medicinales mayormente utilizadas en México	16
2.3. AGUACATE CRIOLLO MEXICANO (LAURACEAE)	18
2.3.1. Etnobotánica y farmacología de aguacate	20
2.3.2. Metabolitos secundarios de aguacate biológicamente activos	23
2.4. PERSINA	25
2.4.1. Actividad citotóxica de persina	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. OBJETIVO GENERAL	29
4.1.1. Objetivos específicos	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	30

	Pág.
5.1.1. Genotipos de aguacate	30
5.1.2. Línea celular	30
5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	31
5.3. IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PERSINA	31
5.3.1. Cromatografía de capa fina	31
5.3.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	32
5.3.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	33
5.4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	33
5.4.1. Cultivo celular	33
5.4.2. Método MTT	34
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
6. RESULTADOS	36
6.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PERSINA	36
6.2. CONTENIDO DE PERSINA EN AGUACATE CRIOLLO MEXICANO	41
6.3. EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO DE AGUACATE CRIOLLO	44
7. DISCUSIÓN	47
7.1. CONTENIDO DE PERSINA EN AGUACATE CRIOLLO MEXICANO	47
7.1.1. Identificación de persina	47
7.1.2. Variación en el contenido de persina	48

	Pág.
7.2. CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO	50
8. CONCLUSIONES	52
9. LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1.	Algunos de los principios activos derivados de plantas prescritos en la medicina moderna (Taylor, 2000).	8
Cuadro 2.	Actividad biológica de acetogeninas.	12
Cuadro 3.	Ejemplo e acetogeninas de Annonaceae con actividad citotóxica.	12
Cuadro 4.	Contenido de compuestos lipídicos en hojas de aguacate criollo mexicano (Tingambato) y cultivar Hass.	38
Cuadro 5.	Contenido de persina ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en extracto clorofórmico-metanólico de hoja de genotipos de aguacate criollo mexicano, durante 4 colectas.	43
Cuadro 6.	Contenido de persina ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en extracto clorofórmico-metanólico de hoja de genotipos de aguacate criollo mexicano, durante 4 colectas.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.	Ruta de Biosíntesis de las Acetogeninas. Modificado de da Souza (2006).	10
Figura 2.	Diferentes tipos de acetogeninas aisladas de plantas de la familia Annonaceae.	11
Figura 3.	<i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> A. ramilla con inflorescencias; B. última división de la inflorescencia; C. vista interior de una flor; D. vista esquemática de (izquierda a derecha): ovario, estambre del primer verticilo, estaminodio y estambre del tercer verticilo; E. fruto inmaduro. Tomado de (van der Werff y Lorea, 1997).	19
Figura 4.	Estructura molecular de Persina.	26
Figura 5.	Cromatogramas representativos de los extractos cloroformo-metanólico (2:1) de hoja de aguacate: A) <i>P. americana</i> Mill. cv Hass; B) <i>P. americana</i> Mill var. <i>drymifolia</i> .	37
Figura 6.	Espectro de masas de persina.	38
Figura 7.	Comparación de los patrones de fragmentación del Dieno 2 (T.R. 16.1 min) con el del ácido Linoleico.	39
Figura 8.	Comparación de los patrones de fragmentación del Trieno 1 (T.R. 18.4 min) con el del ácido Linolénico.	39
Figura 9.	Cromatograma de la fracción activa (F3) del extracto cloroformo-metanólico de hoja de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato. La persina presentó un tiempo de retención de 17.14 min.	40
Figura 10.	Espectro de RMN ¹ H: Desplazamiento Químico (ppm) de RMN ¹ H para Persina (H1 - 4.07; H2 - 4.27; H3 - 2.58 ; H4 - 5.04; H5 - 2.41; H6 - 1.54; H7 - 1.26; H8 - 1.26; H9 - 1.26; H10 - 1.26; H11 - 2.01; H12 - 5.32; H13 - 5.32; H14 - 2.73; H15 - 5.32; H16 - 5.32; H17 - 2.01; H18 - 1.26; H19 - 1.26; H20 - 1.26; H21 - 0.85).	40
Figura 11.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz).	41
Figura 12.	Porcentaje de viabilidad sobre la línea celular MCF-7 del extracto de hoja de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato y de las fracciones de éste: A) 10 µg; B) 10 y 20 µg. A las 48 h del cultivo.	45

	Pág.
Figura 13. Porcentaje de viabilidad sobre la línea celular MCF-7 del extracto de hoja de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato y de las fracciones F1, F3 y F6, a las 48 h del cultivo.	46
Figura 14. Esquema de la variación fenológica del contenido de persina y compuestos relacionados, en hojas de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato.	49

RESUMEN

Valdez Partida Julio. 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 en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 58 p.

La persina, una ecetogenina con propiedades citotóxicas, aislada de hojas y frutos de aguacate, la cual se reporta su presencia en una sola variedad de aguacate criollo (*P. americana* Mill. var. *guatemalensis*) y en varios cultivares de aguacate entre los que destacan el Hass y el Fuerte, no ha sido reportada su presencia en el aguacate criollo mexicano (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*), siendo que este ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional en nuestro país desde la época prehispánica. Para determinar si el aguacate criollo mexicano tiene persina y si existe una variación fenológica en su contenido, se elaboraron extractos cloroformo-metanólicos 2:1 v/v, de tres genotipos. Los extractos se resuspendieron en hexano para ser analizados en Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, donde se detectó la presencia de persina, mediante la interpretación de su espectro de masas, la cual aparece en tu tiempo de retención de 17.1 min en los cromatogramas

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que México posee alrededor de 4,000 a 5,000 especies de plantas con atributos medicinales, esto equivale al 15% del total de su flora conocida. El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas ha trascendido desde la época prehispánica hasta nuestros tiempos gracias a la tradición oral. Los actuales “dueños” de esta información son, algunos de los miembros de los diferentes grupos étnicos de nuestro país. A pesar de esta riqueza de diversidad y del conocimiento tradicional a cerca de las plantas medicinales, los trabajos de validación química y biomédica a cerca de estas plantas, están atrasados. Se calcula que de las 4,000 especies que se tienen registradas con atributos medicinales, solo en 5% de éstas se han llevado a cabo estudios de validación farmacológica, biomédica y de quimiotaxonomía (Huerta, 2002).

Tal es el caso del aguacate (*Persea americana* Mill.) el cual es un árbol originario de México y Centro América, que en la actualidad se cultiva en muchos países del mundo. Este fruto tiene un alto valor nutritivo y se consume como alimento. Se conocen más de 500 variedades de esta planta, generadas por hibridación de tres razas, y todas ellas se caracterizan por su alto contenido en grasas mono insaturadas como el oleico y palmitoleico. El aguacate contiene también lecitina, un fosfolípido necesario para el metabolismo de las grasas y la prevención de la arterioesclerosis y muchos otros nutrientes esenciales como hierro, magnesio, potasio, ácido pantoténico, ácido fólico y vitaminas A, B3 (niacina), B6 (piridoxina), D y E (Bergh, 1992).

Al aguacate “criollo mexicano” (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) se le han atribuido desde la época prehispánica, gran número de propiedades medicinales, tales como emenagogo (fruto), cicatrizante (pulpa de fruto), contra la disentería y la diarrea (semilla y cáscara de fruto), para infecciones e inflamaciones de la piel (hojas), así como para parasitosis intestinales (hojas). El aceite de la semilla obtenido por compresión se usa desde hace siglos para el tratamiento del cabello reseco y otros males del cuero

cabelludo; también como ungüento para aliviar el dolor y suavizar la piel de zonas lastimadas (Gupta, 1995).

Hace más de tres décadas atrás, Kashman y colaboradores, reportaron por primera vez una nueva clase de compuestos obtenidos del aguacate (*P. americana* Mill.). Esta clase de compuestos son derivados de ácidos grasos, posiblemente del oleico, linoleico, linolénico, o ácido esteárico como precursores. Oelrichs y col. reportan en 1995 mediante el uso de técnicas de Espectroscopía de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR) el aislamiento e identificación de una acetogenina presente en las hojas del aguacate (*P. americana* Mill.) denominada persina, la cual presentaba propiedades antifúngicas y tóxicas contra helmintos. Estos productos forman parte del grupo de compuestos conocidos como acetogeninas alifáticas con actividad biológica, las cuales están restringidas a plantas de las familias Annonaceae y Lauraceae (Kashman *et al.*, 1969; Oelrichs *et al.*, 1995).

Estudios recientes indican que las acetogeninas de lauráceas son sintetizadas durante el desarrollo temprano de la planta, en las células de aceite denominadas idioblastos y son transportados de las células de aceite a otras partes de la planta. En aguacate existe la evidencia que indica que los idioblastos y el aceite que contienen, juegan un papel importante en la defensa contra patógenos e insectos (Rodríguez-Saona y Trumble, 2000).

A la persina se le ha reportado con varias actividades biológicas, tales como: inhibidor del crecimiento contra los gusanos de la seda, presenta actividad antifúngica, causa mastitis y agalaxia en ganado lactante y es un inhibidor de óxido nítrico y de la generación de superóxido (Kim *et al.*, 2000). Investigaciones más recientes han descrito que además, la persina posee propiedades efectivas contra el cáncer, se ha demostrado tener una actividad específica contra células cancerosas de mama, inhibiéndolas selectivamente en la fase G₂-M e induciendo el mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas (Butt *et al.*, 2006).

Se ha reportado su presencia en hojas y tallos de aguacate cultivar Hass y en la variedad guatemalteca (*P. americana* Mill. var. *guatemalensis*) (Rodríguez-Saona *et al.*, 1998). La persina se encuentra formando parte del aceite que almacenan los idioblastos, presentes en hojas, semillas, raíces y frutos del aguacate (Platt y Thomson, 1992; Rodríguez-Saona *et al.*, 1998; Domergue *et al.*, 2000). Carman y Handley (1999) reportaron la presencia de persina y su variación en el contenido de ésta en hojas de varios cultivares de aguacate, determinado que el cultivar Hass de todos los que se evaluaron, fue el que mayor contenido de persina presentó. Lo anterior es evidencia de que el contenido de esta acetogenina no solo varía a nivel de parte de la planta, sino a nivel de genotipos o híbridos.

Nuestro país cuenta con diferentes genotipos de aguacate “criollo mexicano” (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*), el cual ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades curativas, y en la actualidad no existen reportes del contenido de persina en ellos. Un estudio comparativo de los niveles de persina en diferentes partes de la planta, en diversos genotipos de esta variedad de aguacate, y la evaluación de su efectividad en contra del cáncer de mama resulta de gran interés. Debido a esto, el objetivo de la presente investigación fue determinar si el aguacate “criollo mexicano” presentaba persina y si ésta mostraba variación en hojas y tallos, así como en las diferentes etapas de desarrollo (fenología). Por las evidencias de su efecto citotóxico contra células de cáncer de mama (células MCF-7), también se determinó la actividad citotóxica del extracto cloroformo-metanólico del genotipo de aguacate “criollo mexicano” con mayor contenido de persina, en células MCF-7.

2. ANTECEDENTES

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y USO DE PLANTAS MEDICINALES

El estudio de las plantas medicinales es hasta la fecha, un factor importante para la investigación y el desarrollo de fármacos, ya que durante el desarrollo de la investigaciones etnobotánicas, se han encontrado y determinado metabolitos con actividad farmacológica, que han sido utilizados para tratar enfermedades cardiovasculares, del sistema nervioso central, y en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer, así como enfermedades gastrointestinales y dérmicas provocadas por microorganismos como bacterias, virus y hongos (Lozoya y Rivera, 1999). Los reportes afirman que hoy en día el 40% de los productos farmacéuticos que se consumen en los países desarrollados proceden de productos naturales, sobre todo de vegetales (Huerta, 2002).

Actualmente se tiene el conocimiento de que muchas de las sustancias derivadas de plantas, cuya actividad farmacológica es trascendente, se producen en las plantas mediante rutas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario, por ello dichas sustancias son llamadas metabolitos secundarios. Muchos de estos componentes, ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre, incluso, algunas de estas sustancias se aprovechan también en la industria farmacéutica, alimentaría, textil, agroquímica, perfumería cosmetología (Hartmann, 2004).

La distribución de los metabolitos secundarios en el reino vegetal se infiere que es amplia, puesto que se estima cerca de 20,000 especies vegetales que son utilizadas medicinalmente (Penso, 1982). Del resto de las especies vegetales, se desconoce si algunos de sus metabolitos poseen algún efecto farmacológico. Por lo que el conocimiento en este campo es limitado y restringido a grupos taxonómicos particulares. La mayoría de los metabolitos secundarios vegetales, generalmente se encuentran en pequeñas cantidades en comparación con lo metabolitos primarios. Se ha encontrado

que cumplen diversas funciones, por ejemplo, algunos metabolitos secundarios son atrayentes de insectos polinizadores, algunos otros representan adaptaciones químicas a cambios del medio ambiente, también sirven como agentes químicos de defensa contra microorganismos, insectos depredadores superiores y otras plantas (Battista y Bettolo, 1988).

El conocimiento etnobotánico está fuertemente enlazado a un factor cultural, y constituye un indicador particular de la respuesta a la enfermedad por parte de los pueblos. Recientemente durante los trabajos realizados en estas áreas, se han determinado metabolitos con actividad farmacológica, principalmente para tratar enfermedades cardíacas, del sistema nervioso central, contra el cáncer, gastrointestinales y dérmicas, entre otras. Microorganismos como bacterias, protozoarios, virus y hongos son causantes del cólera, amibiasis, herpes y pie de atleta respectivamente, en el humano, así como enfermedades venéreas tales como la gonorrea y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Herch, 1999).

Las estructuras de más de 200,000 metabolitos secundarios han sido elucidadas a la fecha, han proveído una enorme diversidad de esqueletos de carbono únicos y modificaciones de grupos funcionales, han generado interés en la industria farmacéutica, agroquímica, principalmente (Hartmann, 2004). El estudio de las plantas medicinales en la actualidad es una actividad importante en el área de la investigación y desarrollo de fármacos; algunos reportes afirman que en hoy día el 40% de los productos farmacéuticos que se consumen en países desarrollados proceden de productos naturales, sobre todo de vegetales (Huerta, 2002).

El efecto terapéutico que una planta puede poseer, se debe al contenido de diferentes metabolitos secundarios como los aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cetonas, flavonoides, etc. Como ejemplos de plantas fuente de este tipo de metabolitos están el Eucalipto, Propóleo, Romero, Ciprés, entre otros (Granada *et al.*, 1988).

Otros de los ejemplos que se pueden citar de sustancias o principios activos que se producen en las plantas, por rutas metabólicas secundarias, es el taxol, que proviene de la planta *Taxus brevifolia* y *T. cuspidata*, este principio activo tiene una actividad de anticancerígeno y antileucémico; la reserpina, principio activo que se encuentra en la planta *Rauwolfia serpentina* y *R. vomitoria*, el cual tiene una actividad como antihipertensivo y tranquilizante; la morfina, principio activo de *Papaver somniferum*, que es uno de los analgésicos más potentes y más empleados en pacientes cuyos padecimientos son muy dolorosos (Taylor, 2000).

2.1.1. Fitoquímica y actividad biológica

El análisis bioquímico de los metabolitos secundarios es complicado ya que es el resultado de la integración de diferentes disciplinas como la química, botánica, microbiología, bioquímica, farmacología e involucra técnicas de análisis tanto tradicionales como modernos. Cuando los compuestos son aislados, purificados e identificados y su actividad biológica es comprobada, pueden utilizarse en medicina herbolaria tradicional o bien, en la medicina alópata para uso en animales y humanos (Anaya *et al.*, 2000).

Aún en los países industrializados, el uso de remedios botánicos está aumentando de manera espectacular. En 1990, el 2.5% de los estadounidenses adquirió remedios del tipo herbolario, incrementándose en 1997 al 12.1%. Las plantas han contribuido al desarrollo del 25 al 50% de todos los fármacos que se recetan en Estados Unidos, ya sea que se extraigan directamente de ellas o que sirvan para crear modelos bioquímicos o plantillas para elaborar compuestos sintéticos (Swedlow, 2000).

En la actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben mundialmente contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta, según datos del *National Prescription audit* de los Estados Unidos de Norteamérica (Kumar, 2004). En el año 2006, el mercado farmacéutico mundial fue de 643 miles de millones de dólares y el mercado de las plantas medicinales llegó a los 62 miles de millones de dólares con una

tasa anual de crecimiento estimada según un informe del Banco Mundial de entre 5 y 15%. Es decir, además de los fármacos derivados de plantas que se comercializan a través de la industria farmacéutica, existe un mercado de hierbas medicinales que se venden como suplementos dietarios o “medicinas naturales o tradicionales” que se encuentra en expansión. Si bien en muchos países pobres de África y Asia no tienen otra opción que usar medicinas naturales, los tratamientos con este tipo de fármacos se han convertido en una alternativa en muchos países ricos (Barquero, 2007).

A nivel mundial son por lo menos unos 120 metabolitos derivados de plantas que se prescriben como medicamentos, algunos ejemplos de las plantas fuente de estos metabolitos se muestran en el cuadro 1 (Taylor, 2000). Entre los principios activos vegetales más usados en terapéutica se han citado principalmente a los compuestos esteroideos (progestágenos, corticosteroides, estrógenos y agentes anabólicos); a alcaloides como atropina y efedrina y sus derivados semisintéticos; a la morfina y derivados hipnoanalgésicos; a la podofilotoxina y su derivado etopóxido; a vincristina, vinblastina y taxol (anticancerígenos); y a los derivados flavonoides del *Ginkgo biloba* (activador cerebral). En los últimos años, se han conferido diversas propiedades curativas a los denominados aceites esenciales.

2.1.2. Compuestos anticancerígenos

El cáncer es una de las enfermedades más mortales en la actualidad, tanto que a nivel mundial mueren más personas por cáncer que por el virus del SIDA (Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida), malaria y tuberculosis. Los estudios realizados a nivel internacional reportan cifras alarmantes, como el hecho de que en 2007 murieron 7.6 millones de personas a causa de algún tipo de cáncer y se registraron 12 millones de nuevos casos, para este año la ONU estima que el cáncer se convertirá en la mayor causa de muerte del planeta, se cree que para el 2030 el cáncer causará 13.2 millones de muertes y se registrarán 21.4 millones de nuevos casos (Castillo *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Algunos de los principios activos derivados de plantas prescritos en la medicina moderna (Taylor, 2000).

Principio activo	Acción/Usó clínico	Fuente Vegetal
Agrimofol	Antihelmíntico	<i>Agrimonia supatoria</i>
Ajmalicina	Desórdenes circulatorios	<i>Rauwolfia serpentina</i>
Anisodamia	Anticolinérgico	<i>Anisodus tanguticos</i>
Bergenina	Antitusivo	<i>Ardisia japonica</i>
Camptotecina	Anticanceroso	<i>Camptotheca acuminata</i>
Cocaína	Anestésico local	<i>Erythroxylum coca</i>
Colchicina	Agente antitumoral	<i>Colchicum autumnale</i>
Curcumina	Anticolesterol	<i>Curcuma longa</i>
L-Dopa	Agente anti - parkinson	<i>Mucuna sp.</i>
Digitalina, Digitoxina	Cardiotónico	<i>Digitalis purpurea</i>
Ácido Kaibico	Ascaricida	<i>Digenea simples</i>
Kheltina	Broncodilatador	<i>Ammi visaga</i>
Ácido Nordihidroguaiarético	Antioxidante	<i>Larrea divaricada</i>
Quinina	Antimalárico, antipirético	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Reserpina	Antihipertensivo, tranquilizador	<i>Rauwolfia serpentina</i>
Silimarina	Antihepatotóxico	<i>Silybum marianum</i>
Taxol	Agente antitumoral	<i>Taxus brevifolia</i>
Timol	Antifúngico (tópico)	<i>Thymus vulgaris</i>
Vinblastina y Vincristina	Agente antitumoral, antileucémico	<i>Catharanthus roseus</i>
Yuanhuadina	Abortivo	<i>Daphene genkwa</i>

En particular, el cáncer de mama es una grave amenaza para la salud de la mujer a nivel mundial, en México desde 2006 el cáncer de mama es causante de un mayor número de muertes que el cáncer cérvico-uterino. Esta afección es la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años de edad y amenaza a todos los grupos socioeconómicos. Se estima un incremento cercano a 16,5000 nuevos casos para el año 2020, y solo el 10% de los casos se identifica en etapa I, además los servicios son escasos y las

intervenciones de detección temprana, en particular la mamografía, aún son muy limitadas (Knaul *et al.*, 2009).

Actualmente existen ya diversos tratamientos contra el cáncer con diferentes porcentajes de éxito, que varían desde la clásica quimioterapia hasta los nuevos avances como la nanotecnología y las técnicas modernas de microscopía, que están teniendo un auge muy importante. Aunque estos son avances muy notables en el conocimiento, tratamiento y prevención de la enfermedad, siguen existiendo aún muchas interrogantes. El alto costo humano que provoca mundialmente esta enfermedad obliga a dirigir la mirada hacia la búsqueda de una cura efectiva, o de alternativas que mejoren la calidad de vida de los enfermos. Hasta el momento, solo la prevención se perfila como la mejor arma para combatir el cáncer, sin embargo, luego de años de rigurosos estudios científicos, diferentes grupos de científicos en el mundo han logrado significativos avances, proponiendo el uso de productos naturales en las terapias contra el cáncer. Ejemplos de ellas son algunos compuestos o extractos derivados de las plantas (Huerta, 2002).

Los alcaloides vinblastina, vincristina, vindecina y vinorelvina (*Catharanthus roseus*), los taxanos como paclitaxel y docetaxel (*Taxus brevifolia*), la epipodofilotoxina (*Podophyllum peltatum*) y las camptotecinas como el topotecán, irotecán y camptotecina (*Camptotheca cuminata*), son algunos de los compuestos anticancerígenos de origen vegetal (Collet, 1998). En las últimas décadas se ha reportado la presencia de un tipo de compuestos llamados acetogeninas, aislados principalmente de plantas de la familia Annonaceae como la guanábana (*Annona muricata*), estos compuestos al parecer son altamente bioactivos y presentan actividad citotóxica contra varias líneas celulares de distintos tipos de cáncer (da Souza, 2006).

2.1.3. Acetogeninas

Las acetogeninas son un grupo de metabolitos secundarios que representan un tipo de compuestos relativamente nuevos. Son compuestos restringidos a plantas de las familias Annonaceae y Lauraceae. La primera acetogenina, la uvaricina fue aislada en 1982 de

Uvaria accuminata (Annonaceae), la cual presentó una alta actividad antileucémica y marcó el inicio para el estudio de esta clase de compuestos (Rupprecht *et al.*, 1990).

Las acetogeninas son derivados de ácidos grasos de cadena larga, aunque su ruta de biosíntesis aún está completamente elucidada (Figura 1), contienen típicamente dos cadenas largas hidrocarbonadas, una de las cuales conecta a un grupo terminal γ -lactona, con un número variado de anillos tetrahidrofuranos (THF) (Figura 2), los cuales hasta este momento solo se han encontrado en la familia Annonaceae. Las cadenas hidrocarbonadas se presentan oxigenadas, en forma de grupos hidroxilo, acetiladas y/o con cetonas. Hay acetogeninas sin anillos THF, los cuales son remplazados por dobles enlaces (dienos) tal es el caso de persina una acetogenina de *Persea americana* Mill. (Fang *et al.*, 1993; Rodríguez-Saona y Trumble, 2000; Chang y Wu, 2001).

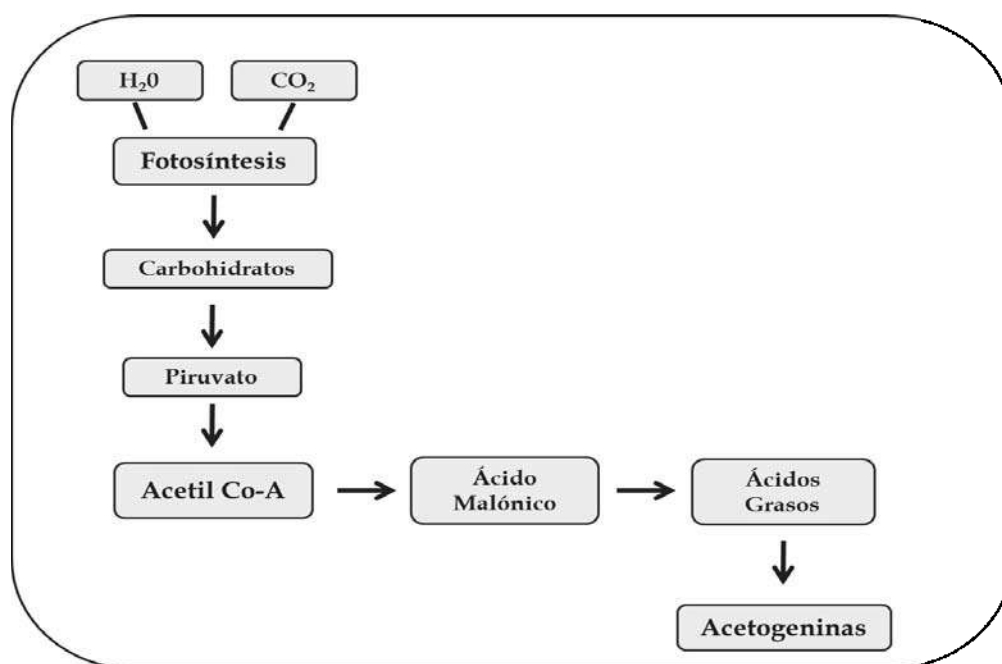


Figura 1. Ruta de Biosíntesis de las Acetogeninas. Modificado de da Souza (2006).

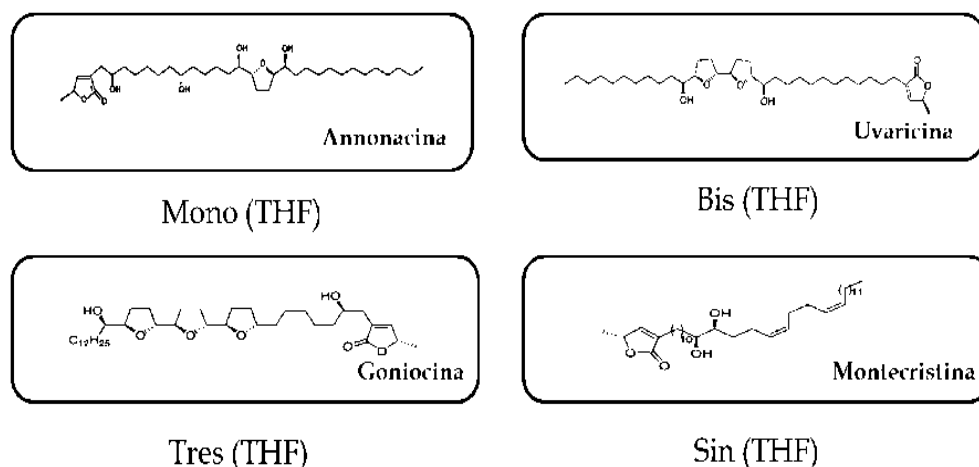


Figura 2. Diferentes tipos de acetogeninas aisladas de plantas de la familia Annonaceae.

Las acetogeninas son compuestos bioactivos y presentan alto potencial como agentes antitumorales, citotóxicos, inmunosupresivos, pesticidas y antimicrobianos (Cuadro 2). Debido a la actividad que presentan, este tipo de compuestos han atraído la atención de los investigadores a nivel mundial (Gleye *et al.*, 2001).

En el cuadro 3 se presenta una lista de acetogeninas aisladas de plantas de la familia Annonaceae, que han sido probadas con distintas líneas celulares cancerosas y han presentado actividad citotóxica. Tal es el caso de la Uvaricina, una acetogenina aislada de *Uvaria acuminata*, la cual Jolad y col. en 1982 la reportan como un compuesto citotóxico contra la línea celular Hep2G2 derivada de carcinoma de hígado. Asimismo, la Bullatacina, otra acetogenina con potencial antitumoral, la cual Oberlies y col. en 1994 la reportan como citotóxica contra la línea celular HeLa de carcinoma cérvico-uterino.

Cuadro 2. Actividad biológica de acetogeninas.

Acetogenina	Actividad	Referencia
Uvaricina <i>Uvaria acuminata</i>	Antileucémico	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990
Anonacina <i>Annona glauca</i>	Citotóxico y Antihelmíntico	Rieser <i>et al.</i> , 1991
Crasiflorina <i>Annona crasifolia</i>	Citotóxico	Phineiro <i>et al.</i> , 1994
Bullatacina <i>Annona atemoya</i>	Induce Apoptosis	Hui-Fen Chiu <i>et al.</i> , 2003
Rolliniastatina 1 <i>Rollina emarginata</i>	Antileishmaniasis	Raynaud-Le <i>et al.</i> , 2004
Mezcla de Acetogeninas de <i>Annona cherimolia</i>	Citotóxico	García <i>et al.</i> , 2006
Muricina H <i>Annona muricata</i>	Citotóxico	Quispe <i>et al.</i> , 2006
Anomuricina A <i>Annona muricata</i>	Antimalárico	Ocampo <i>et al.</i> , 2006
Mezcla de Acetogeninas de <i>Annona muricata</i>	Tóxico sobre Ninfas de <i>Periplaneta americana</i> L.	Robledo <i>et al.</i> , 2008

Cuadro 3. Ejemplo e acetogeninas de Annonaceae con actividad citotóxica.

Acetogenina	Línea Celular	Referencia
Uvaricina <i>Uvaria acuminata</i>	HepG2 Carcinoma de Hígado	Jolad <i>et al.</i> , 1982
Bullatacina <i>Asimina triloba</i>	HeLa Carcinoma Cervicouterino	Oberlies <i>et al.</i> , 1995
Scuamostolido <i>Annona squamosa</i>	CNE2 Carcinoma Nasofaríngeo	Xie <i>et al.</i> , 2003
Acetogeninas de <i>Annona cherimolia</i>	CaLo Carcinoma Cervicouterino	García <i>et al.</i> , 2006
Muricina H <i>Annona muricata</i>	H460 Cáncer de Pulmón	Quispe <i>et al.</i> , 2006

2.2. USO DE PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

El primer libro de herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes fuentes bibliográficas históricas de la materia médica en América, lleva por título *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (librito de las yerbas medicinales de los indios), que se conociera cuatro siglos después como Códice Badiano, es una obra en la que se describen más de 150 plantas nativas de México y donde se consta su uso medicinal (Valverde, 1984).

El códice Badiano, también conocido como Códice De la Cruz-Badiano, es un libro sobre la herbolaria mexicana, escrito originalmente en náhuatl por el xochimilca Martín de la Cruz, alumno del Colegio de Santa Cruz de Tlatelolco en 1552. El original en náhuatl ha desaparecido pero posteriormente fue traducido al latín por Juan Badiano, también Xochimilca y estudiante del Colegio de Santa Cruz. Otro nombre con que se conoce este códice es Barberini, debido a que Francesco Barberini lo poseía durante los primeros años del siglo XVIII (Valverde, 1984).

En la relación con las plantas empleadas en el tratamiento de las enfermedades en el *Libellus de la Medicinibus Indorum Herbis*, se han realizado una serie de estudios conducentes a dilucidar el papel que éstas tenían en la medicina prehispánica, así como las plantas empleadas para un tratamiento. Entre las usadas para las alteraciones del sueño son dignas de mención el *tlazolpahtli* cuyo efecto de tipo mágico sería limpiar al insomne de pecados y preocupaciones; al contrario la hierba cochizápotl, que sería empleada también contra el insomnio en virtud de la observación de los antiguos mexicanos de que hace dormir; efecto que en la actualidad le es reconocido indirectamente debido a la acción hipotensora de esta planta, que no es otra que el zapote blanco (*Casimiroa edulis*). Basten estos dos ejemplos para precisar que el empleo que hacían los antiguos mexicanos de las plantas medicinales estaba sustentado lo mismo en la observación empírica, que en el uso mágico; sin embargo, es mucho lo que falta saber sobre ambas situaciones, y sobre puntos intermedios que van desde uno a otro de los polos antes mencionados (Aranda, 2003).

Desde hace tiempo se sabe que México junto con Centro América, constituyen una de las regiones donde se concentra una gran diversidad de especies y de casi todos los tipos de vegetación que se conoce en nuestro planeta (Rzedoswki, 1978). En la actualidad se piensa que México posee aproximadamente 30,000 especies de plantas vasculares, teniendo una flora más basta que la de los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (Rzedowski, 1991). Para el caso del Estado de Michoacán no se conoce con exactitud el número de especies, pero de manera conservadora se cree que existen alrededor de 4, 420 especies de angiospermas (Rodríguez y Espinosa, 1995), muchas de estas presentan gran variedad de formas en su uso.

Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen un potencial terapéutico. Un total de de 3,000 especies han sido compiladas en un atlas de plantas medicinales empleados por diversos grupos étnicos. Increíblemente, aproximadamente sólo el 1% de las plantas medicinales ha sido estudiado a fondo, considerando sus propiedades medicinales potenciales. Por lo tanto, es claro que debe llevarse a cabo mayor investigación clínica y etnobotánica (estudio de las diversas culturas indígenas y el uso que éstas hacen a las plantas que los rodean), en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal de varias plantas medicinales (Argueta *et al.*, 1994; Lozoya, 1994; Aguilar 1999).

En trabajos más recientes en nuestro Estado, Michoacán, se muestra la importancia que reviste el conocimiento de las plantas medicinales en sus diferentes municipios, es el caso de Farfán (2001) sobre aspectos ecológicos y etnobotánicos en la comunidad Mazahua de Francisco Serrato en Zitácuaro, quién determinó 190 especies útiles, comprendida en 58 familias y 130 géneros: Destaca dentro de sus resultados a la Familia Asteraceae con un alto porcentaje de uso, principalmente forrajero y medicinal (24.21%), seguida por la familia Gramineae (6.32%). Señala asimismo que del total de plantas útiles, el 13.68% corresponden a las medicinales.

Por su parte Huerta (2001) realizó un estudio sobre las plantas medicinales que se comercializan en el mercado independencia en la ciudad de Morelia, Michoacán, registra

para ello, 137 especies de plantas medicinales, pertenecientes a 67 familias botánicas, de las cuales 113 son originarias del estado (82%). También llevó a cabo un estudio cuantitativo y cualitativo de la flora medicinal de Copándaro, Michoacán, registrando 103 especies comprendidas dentro de 36 familias, siendo las más importantes por el número de género y especies: Asteraceae, Labiatae, Leguminosae y Solanaceae. En un estudio florístico de plantas arvenses en cultivos de maíz dentro del municipio de Villa Morelos, Michoacán se registraron 7 categorías de uso, dentro de ellas 28 especies son medicinales, con la familia Asteraceae mejor representada (24. 49%). Asimismo, en un trabajo sobre plantas útiles de San Pedro Júcaro municipio de Ciudad Hidalgo, Michoacán, se identificaron 160 especies, agrupadas en 134 géneros y 47 familias, de este total de especies 85 fueron medicinales en la comunidad de Cutzátaró, Michoacán. Se han registrado el uso de 67 especies medicinales pertenecientes a 60 géneros y 29 familias, la familia botánica con mayor número de especies medicinales fue Asteraceae con un total de 13 especies (Bello, 2006).

Aparte de los trabajos michoacanos antes citados, existen otros que han trascendido a través de la historia, entre los que destacan los siguientes: La historia antigua de México por Javier Clavijero (1780) quien dedica algunos capítulos a las plantas útiles y en particular las medicinales. En 1790 Martín Sessé y J. mariano Mociño inician estudios sobre los recurso naturales de México, en cuya travesía pasan por Cuitzeo y Morelia colectando e identificando plantas medicinales con sus respectivos usos (Mc Vaugh, 1977).

2.2.1. Avances en validación del conocimiento tradicional

Pese a la situación privilegiada que posee México en diversidad de plantas medicinales y el conocimiento tradicional que se tiene al respecto, el rescate (documentación) y la validación de estos conocimientos y recursos biológicos, es una actividad reciente, pues los estudios que se han hecho para llevar a cabo estas actividades datan de hace tres décadas. De los grupos pioneros en este campo de investigación, destacan el trabajo de investigadores de la universidad de UTAH en 1975, quienes fueron los primeros en

realizar estudios de validación científica de la herbolaria Azteca. Estos investigadores trabajaron con 25 plantas medicinales citadas en documentos del siglo XVI (documentos como Códice De la Cruz-Badiano y La historia General de las Cosas de la Nueva España de Fray Bernadino de Sahagún) y pudieron comprobar que los principios activos extraídos de ellas, poseían las propiedades terapéuticas referidas en los documentos. Se estima que en México de las 4000 a 5000 especies con potencial medicinal que se tienen registradas, solo en un 5% de estas especies se han llevado a cabo estudios de validación farmacológica, biomédica y de quimiotaxonomía (Huerta, 2002).

2.2.2. Plantas medicinales mayormente utilizadas en México

Aunque los reportes indican un sinnúmero de las plantas medicinales más utilizadas en nuestro país, las más nombradas son gordolobo (*Gnaphalium sp.*), eucalipto (*Eucalyptus*, probablemente *E. globulus*), hierbabuena (*Menta sp.*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*), nopal (*Opuntia sp.*, probablemente *Opuntia ficus_indica*), árnica (*Heterotheca spp.*), guarumbo (*Cecropia obtusifolia*), verbena (*Verbena carolina*), saúco amarillo (*Tecoma stans*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), la sábila (*Aloe vera*), ruda (*Ruta graveolens*), romero (*Rosmarinus ofilinalis*), etc. (Linares *et al.*, 1990; Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

El gordolobo es una planta que se usa principalmente para trata afecciones respiratorias como la tos, la bronquitis o la inflamación de las mucosas, para lo cual se hierven las ramas y flores; cuando hay heridas contusiones y esguinces, dolores reumáticos, cólicos menstruales, gastritis y úlceras, se recurre con frecuencia al árnica, que puede ser tomada como té o usarse como emplasto mezclado con manteca que se aplica sobre la herida o la zona dolorida; el guarumbo, Chancarro, trompeta u hormiguillo (*Cecropia obtusifolia*) es una planta medicinal muy apreciada desde el centro hasta el sureste del país para los casos de diabetes, para lo cual se prepara una infusión de hojas, ramas, corteza o raíz que se toma como agua de tiempo; es posible que la manzanilla, camomila o chamomilla sea una de las plantas más utilizadas, los antiguos mexicanos las

empleaban para tratar trastornos digestivos, como vómito, gastritis, disentería indigestión, cólicos, bilis e infección del estomago entre otros. La verbena, ajeno grande, hierba de San José, chilillo o poleo negro, es una planta a la cual se le atribuye virtudes como purgante y para sanar padecimientos de tipo digestivo, como el vómito, la diarrea, el dolor de estómago o la disentería, sin embargo se usa más para el tratamiento de la bilis, debilidad, e inapetencia y dolores de cabeza; al tronadora o saúco amarillo se usa ante todo para tratar diabetes y padecimientos digestivos, epiteliales, respiratorios y ginecológicos; el epazote es una planta que se usa principalmente para tratar problemas de amibiasis y lombrices intestinales, para lo cual se prepara una cocción de las ramas en agua o en leche, se le deja reposar durante la noche y se toma en ayunas durante una semana y media; la sábila, zábila, o *toechiio psosacmentl* es una de las plantas con los usos más variados como medicamento, ya que como cataplasma, posee propiedades emolientes y desinflamatorias, por lo que se le utiliza con mucha frecuencia en los casos de quemaduras, y otras clases de lesiones; la ruda es otra de las plantas cuyo uso se ha extendido para tratar un gran número de enfermedades en la medicina tradicional, es muy utilizada para combatir el dolor del estómago, la infusión de esta planta ayuda a facilitar la menstruación y combate los dolores menstruales, los espasmos musculares, estimula la circulación cuando hay várices y disminuye las molestias de la menopausia; El romero es una especie que se usa en forma de infusión para tratar problemas como la anemia y para detener el flujo menstrual, sirve así mismo para aliviar la inflamación del colon, y se ha registrado su uso para combatir la epilepsia, fortalecer la circulación y aliviar los estados de anemia y la impotencia; el nopal, la avena o el apompo, se utilizan como antidiabéticos (Linares *et al.*, 1990).

En México, muy pocas plantas nativas han sido reportadas con actividad citotóxica, entre ellas están *Karwinskia parvifolia* (línea celular hepatoma) (Rivas-Galindo y Waksman, 2001); *Hamelia patens*, *Dioon spinulosum* y *Gossipium schottii* (línea celular HeLa) (Mena-Rejón *et al.*, 2009); *Rhoeo discolor* (línea celular hepatoma) (Rosales-Reyes *et al.*, 2008); *Anemopsis californica* (línea celular MCF-7) (Daniels *et al.*, 2006); y *Juniperus communis* (línea celular MCF-7) (van Slambrouck *et al.*, 2007).

2.3. AGUACATE CRIOLLO MEXICANO (LAURACEAE)

El aguacate “criollo mexicano” (*Persea americana* Mill. *drymifolia*) es un árbol hasta de 40 m de altura; ramillas rollizas, pubescentes o glabras, frecuentemente con grupos de cicatrices de brácteas en la base de las secciones de crecimiento anual; yemas terminales pubescentes; hojas espaciadas o algunas veces hacinadas cerca de la punta de las ramas, en ocasiones ausentes por corto tiempo (plantas deciduas), peciolo de 1 a 5 cm de largo, pubescentes o glabros, láminas variables en forma, por lo común angosta a ampliamente elípticas, de (6)10 a 18(30) cm de largo, por (2.5)5 a 12 cm de ancho, ápice redondeado, obtuso o agudo, algunas veces acuminado, base aguda a redondeada, verdes o glaucas en el envés, venas laterales 6 a 8(10) pares, inmersas en la haz, más o menos prominentemente elevadas en el envés, venas terciarias formando un retículo fino, cartáceas, haz glabra, envés glabro o variadamente pubescente, algunas veces con olor a anís; inflorescencias axilares o usualmente hacinadas en la base de las ramas nuevas, de (3.5)5 a 11 cm de largo, glabras o pubescentes, pedicelos florales de 4 a 8 mm de largo, pubescentes; flores subcampanuladas, de 5 a 5.5 mm de largo, amarillentas; tépalos elípticos o angostamente elípticos, de 3.7 a 6.3 mm de largo, por 1.8 a 3 mm de ancho, los externos ligeramente más cortos que los internos, densamente pubescentes en la cara exterior e interior; estambres de los verticilos I y II de 2.8 a 3.7 mm de largo, filamentos del doble de la longitud de las anteras, densamente pubescentes, anteras glabras excepto por la base del conectivo que es adaxialmente pubescente al igual que la base de la antera del lado abaxial, estambres del verticilo III de 3 a 4.3 mm de largo, filamentos del doble o más de la longitud de las anteras, densamente pubescentes, anteras pubescentes en su mitad inferior adaxialmente, pubescentes en la base al igual que en el conectivo abaxialmente, glándulas de 0.4 a 0.8 mm de largo, elípticas, conspicuamente pediceladas, pedicelos tan largos o más largos que las glándulas, pubescentes, estaminodios de 1.1 a 2.2 mm de largo, con filamentos pubescentes abaxial y adaxialmente, ápice pubescente en su base adaxialmente, pubescente abaxialmente; hipanto ausente; ovario y estilo pubescentes; fruto piriforme o globoso, de 5 a 15 cm de largo, tépalos deciduos o brevemente persistentes en el ápice del pedicelo (Figura 3) (van der Werff y Lorea, 1997).

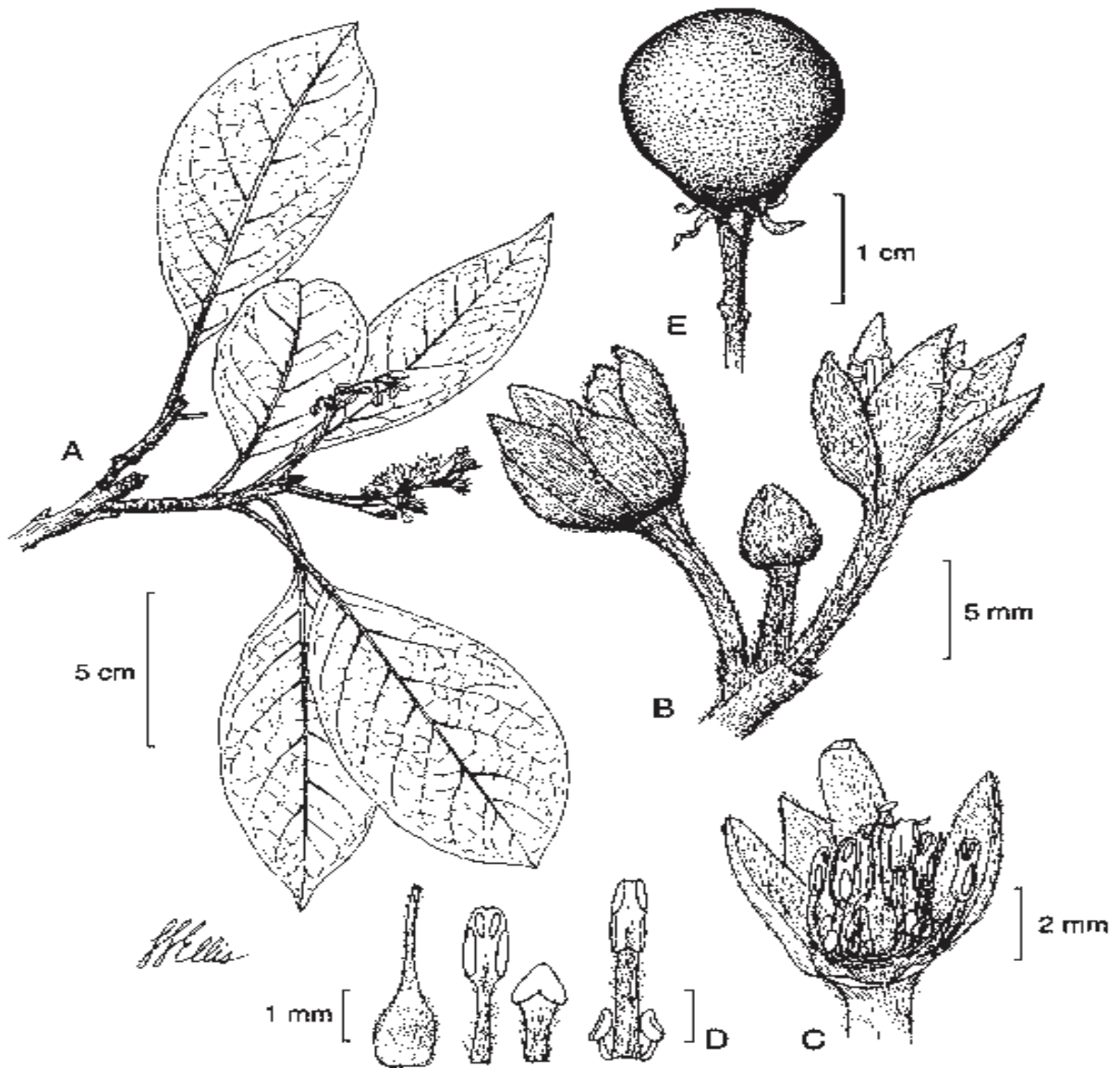


Figura 3. *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* A. ramilla con inflorescencias; B. última división de la inflorescencia; C. vista interior de una flor; D. vista esquemática de (izquierda a derecha): ovario, estambre del primer verticilo, estaminodio y estambre del tercer verticilo; E. fruto inmaduro. Tomado de (van der Werff y Lorea, 1997).

P. americana Mill. var. *drymifolia* se encuentra en un rango altitudinal de 850 a 1700 msnm, principalmente en lugares cubiertos por bosque mesófilo de montaña, encinares muy húmedos así como por la vegetación secundaria correspondiente. Su época de floración es de enero a marzo mientras que la de fructificación es de abril a junio. Se cultiva ampliamente en México por sus frutos comestibles (van der Werff y Lorea, 1997).

Por otro lado, México forma parte del centro de origen de la especie, por lo que alberga una amplia diversidad genética, sobre todo de variedades criollas entre las más importantes es el aguacate “criollo mexicano”, por su uso como portainjerto del cultivar Hass y por su alto potencial como planta medicinal (Sánchez-Pérez, 2001; Bello-González, 2006).

2.3.1. Etnobotánica y farmacología de aguacate

La semilla contiene un fluido lechoso con el olor y gusto de almendra. A causa de su contenido de taninos, se vuelve rojo cuando se expone al sol, proveyendo un rojo indeleble, tinta marrón o negra fue usada para escribir muchos documentos en los días de la Conquista Española, estos archivos se conservan ahora en Popayán. La tinta también se usaba para marcar algodón y lienzos textiles. En Guatemala, la corteza se hierva con tinturas para extraer el color (Alfaro y Evangelista, 1995). Se ha reportado el uso de esta planta y sus productos como terapéuticos, artesanal e insecticida y fungicida, por lo cual diversas investigaciones se han realizado cubriendo aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos.

Entre los nahuas del Río Mezclala (Guerrero), las hojas del aguacate criollo (*awakatl*) se utilizan contra la diarrea, el vómito, como desparasitante intestinal y para lavar el pelo; con la corteza del árbol se hacen te antidiarreicos, febrífugos y estomáquicos (Salomón, 1983; Ramírez, 1991). Usos análogos se encuentran en la mixteca oaxaqueña y entre los Coras de Nayarit, donde el árbol se conoce como *iyaujka* (Gispert-Cruells y Rodríguez, 1998).

Los P'urépechas de la Meseta y del lago de Pátzcuaro (Michoacán) utilizan el aguacate (*kupanda*) en comida como antidiabético, la cáscara en decocción contra los lombrices intestinales, las semillas, molidas y enjuagadas, para vigorizar y dar brillo al pelo; las hojas, tomadas en decocción sirven contra los dolores de muelas, contra los resfriados y, tostadas con sal y aplicadas calientes, como antiinflamatorio y desinflamante de los golpes (Gioanetto y Blas, 2000). Bello-González (2006) lo reporta como antiséptico y se aplica directamente en las heridas. La madera del aguacate recuperado de podas se emplea en Paracho para fábricas guitarras y violines, juguetes y artesanías de madera.

Hernández (1570-1577; Obras completas, tomo I, cap.CIII ed. 1959) indica el nombre azteca del aguacate *Ahuacacuahuitl* (“árbol de los testículos”) y señala algunos de sus usos medicinales durante la época prehispánica: las hojas empleadas en baños como tónico corpóreo y el aceite del hueso contra el salpullido, la disentería y como cicatrizante de llagas (Alfaro, 1984).

Actualmente en México, numerosas poblaciones indígenas y mestizas siguen manteniendo prácticas terapéuticas que emplean las diferentes partes del recurso aguacate en decenas de preparaciones herbolarias curativas. En la Sierra Norte de Puebla, las hojas del aguacate sirven para saborear diferentes comidas y como condimento en las gorditas de alverjón. A nivel medicinal, los Totonacos (donde el aguacate es conocido con el nombre de *kukuta*, *kuka'taj*) (Alfaro, 1984), los Nahuas (*ahuacatl*), los Tepehua (*cakuta*) emplean la semilla, molido en supositorio contra el “susto”, las hojas mezcladas en alcohol y untadas como antirreumáticas, antineurálgicas y antiepilépticas; la decocción de las hojas es tomada contra la diarrea, los cólicos, los dolores del estómago y de cabeza, el vómito, la tos, para inducir y provocar el parto, contra la tiña, como tonificante del cuero cabelludo y contra la caspa, como vermífugo y desparasitante intestinal. Hasta la cascarilla del “hueso” es tomada en decocción contra las lombrices intestinales. Otros grupos totonacos de Papantla (Puebla) emplean las hojas en baños contra la escarlatina, la bronquitis, en baños tónicos post parto, como hemostático y antidolorífico local contra los dolores provocados por un trabajo pesado; la cáscara del fruto, dejada a macerar en agua una noche, es tomada como antiparásito

intestinal. Las propiedades calmantes, astringentes y cicatrizante son debidas a la presencia de algunos principios activos del fruto como la serotonina, la triptamina y el heptadecatriol insaturado (Ortíz de Montellano, 1993).

En diferentes poblados del Estado de Morelos, las semillas del aguacate son usados en preparaciones medicinales destinadas como antidiarreico (decocción a tomar), contra el dolor de estómago (decocción a tomar) y contra el empacho; en Tlatempa se señala su uso como afrodisíaco. Los mixtecos de Alcozauca (Guerrero), donde el aguacate es conocido como *tichí* u *tishi*, las hojas son tomadas en decocción por sus propiedades antidiarreicas, antivomitivas, contra los cólicos y el agotamiento. Se distinguen ocho variedades locales (aguacate de leche, criollo, de bola, montanero, paraguayo, cuello de ganso, roñoso, pagua) que se consumen por su fruto y por las propiedades condimentarias de las hojas (Baytelman, 1992).

El banco de datos del IMEPLAN (1990) enlista las siguientes propiedades terapéuticas populares de la especie en el país: afrodisíaco, contra abscesos, aftas, anginas, anticatarral, antidiarréico, antidisentérico, antineurálgico, contra la sarna, el paludismo y los empeines, como antiparasitario, antitumoral, antirreumático, aperitivo, astringente, catártico, cicatrizante y regenerativo de llagas y heridas, emenagogo, eupéptico, hemostático, pectoral y expectorante, carminativo, contra contusiones, dermatosis, enfermedades exantemáticas, sordera, tiña, como tónico capilar y para aumentar la secreción espermática (Ortíz de Montellano, 1993).

En Chiapas, los Tzoltziles que llaman esta especie *on*, empleando las semillas molidas y calientes en aplicaciones externas sobre la garganta contra las infecciones y los dolores del aparato respiratorio y bucal. En el distrito de Ocotlán (Oaxaca) se emplean las hojas del aguacate en bebida como abortivas y para acelerar las contracciones durante el parto; los chinantecos de la Sierra Madre Occidental del distrito de Chinantla (Oaxaca) emplean las hojas como contraceptivo y emenagogo. Las propiedades abortivas, de hemostático uterino, de tonificante posparto y/u emenagogas del aguacate son bien conocidas en muchas farmacopeas tradicionales americanas y africanas, debido a la

presencia en las hojas de los alcaloides serotonina y tiramina (que demostraron una actividad estimulante *in vitro* de los muslos uterinos y del estragol con sus propiedades inhibitorias oxitócicas y como remedio contra la dismenorrea, a través de su actividad inhibitoria sobre la monoamina oxidasa (Ortíz de Montellano, 1993).

Los indígenas Kichapoo del norte de Coahuila emplean los huesos del aguacate machacados y tomados en decocción como hemostático uterino en caso de aborto u después del parto. En archivos del IMSS se enlistan las siguientes propiedades medicinales de esta especie (Alfaro, 1984):

Hojas: Tomadas en infusión como vermífugo intestinal (nahuas de Puebla), tomadas en decocción contra la diarrea (Quimixtlan, Puebla); tomadas en infusión contra los dolores de estómago (mixes de Oaxaca y en Ixcacautitla, Veracruz); tomadas en infusión y frotadas en el cuerpo contra cólicos, parásitos intestinales y reumatismos (Culiacán y El Dorado, Sinaloa); hervidas en agua y aplicadas en baños de temazcal como desinfectante de la mujer después del parto (Xoloxtoc, Morelos); tomadas en decocción contra los dolores de muelas y odontálgico (Jesús del Monte, Michoacán).

Semilla: molida y aplicada con aceite como antiinflamatorio sobre fracturas y moretones (otomíes del Estado de México); molida en agua y aplicada en todo el cuerpo contra el “susto” (nahuas de Puebla); raspada, macerada en agua y tomada como vermífugo intestinal (Tenampilco, Puebla).

Ramas: hervidas en agua y aplicadas en baños para desinfectar la matriz después del parto (Guerrero).

Cáscara del fruto: macerada en agua y tomada como vermífugo intestinal (Misantla, Veracruz).

2.3.2. Metabolitos secundarios de aguacate biológicamente activos

Se han aislado varios metabolitos secundarios biológicamente activos de aguacate, aunque los reportes generalmente se refieren a variedades o cultivares comerciales como el “Hass” (*P. americana* Mill.) o criollos como el Guatemalteco (*P. americana* var. *guatemalensis*). Algunos de ellos han demostrado diferentes tipos de actividades:

1. **Antifúngica:** Cuatro compuestos aislados de la cáscara de frutos inmaduros de aguacate identificados como: 1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-ino, 1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-eno, y 1-acetoxi-2-4-dihidroxi-16-ino, (este último ya se había detectado previamente en semillas de aguacate) y el más potente 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicoso-12,15-dieno, poseen notable actividad contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Domergue *et al.*, 2000).

2. **Bactericida:** Un extracto de semillas de aguacate exhibió actividad contra algunas bacterias Gram-positivas, siendo el compuesto más activo del extracto un compuesto alifático de cadena larga, 1,2,4-trihidroxi-nheptadeca-16-eno (Neeman *et al.*, 1970).

3. **Insecticida:** Un aceite extraído de las células del idioblasto del mesocarpio del aguacate, fue tóxico contra larvas de *Spodoptera exigua* y se identificó como (12Z, 15Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicoso-12,15-dieno (persina) (Rodríguez-Saona *et al.*, 1998; Rodríguez-Saona y Trumble, 2000).

4. **Antiviral:** Algunos extractos de hojas de aguacate tanto acuosos como metanólicos, tuvieron actividad moderada contra el HIV-1 (virus de la inmunodeficiencia humana) en pruebas *in vitro* (Wigg *et al.*, 1996). Una infusión de hojas de aguacate mostró una fuerte inhibición del virus del herpes tipo 1 (HSV-1); se aislaron los monoglicósidos flavonol y kaempferol, así como quercetina y otros derivados. Las sustancias aisladas fueron menos activas que la infusión (de Almeida *et al.*, 1998).

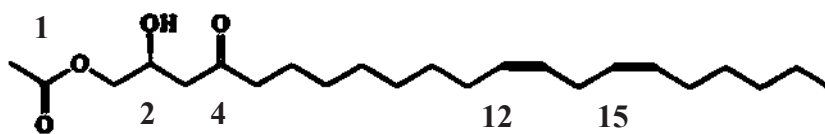
5. **Antioomiceto:** Zaki y Col. (1973), reportaron haber encontrado en extractos de órganos (Hojas, frutos y raíces) de *Persea borbonia*, una especie incompatible con *P. americana*, un compuesto químico que era tóxico a *Phytophthora cinnamomi*. Posteriormente el compuesto fue aislado y caracterizado, y se le dio el nombre de borbonol. Este compuesto es un carbohidrato de cadena larga con un anillo lactona, y se postuló que la presencia de ese compuesto podría ser la base de la resistencia a *P. cinnamomi*, y que las especies de *Persea* con bajas o nulas concentraciones de borbonol en sus raíces serían susceptibles.

6. **Anticancerígeno:** Butt y cols. (2006) observaron que el ciclo celular de las células de cáncer de mama humano incubadas en presencia de persina se bloquea selectivamente en la fase G₂-M y además se induce el mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas. La evidencia obtenida hasta ahora indica que la persina estaría actuando de forma similar al Paclitaxel, un fármaco que interfiere con el rompimiento normal de los microtúbulos durante la división celular y que es empleado en la quimioterapia contra el cáncer de mama, pulmón, ovario y otros más. Las evidencias de diversas investigaciones demuestran que la persina es una acetogenina con actividad anticancerígena (Roberts *et al.*, 2007).

2.4. PERSINA

La persina es una acetogenina sintetizada en los idioblastos presentes en hojas y frutos de aguacate (*P. americana* Mill.), su función natural es de insecticida y fungicida. Es un derivado de ácidos grasos de cadena larga, posiblemente C:18 (oleico, linoleico, linolénico, o ácido esteárico como precursores) (Figura 4). La concentración de persina en hojas varía con el cultivar, Carman y Handley (1999) reportan el mayor contenido en hojas del cultivar Hass (4500 µg/g, peso fresco), documentando que los valores de persina varían entre diferentes híbridos, encontrando cantidades indetectables en híbridos naturales de la variedad Guatemalteca. También reportan que no encontraron diferencias significativas en el contenido de persina entre hojas jóvenes y maduras. La existencia de esta acetogenina en el aguacate “criollo Mexicano” no se ha reportado, pero las evidencias indican su presencia debido a las propiedades antimicrobianas que esta planta medicinal posee (Bello-González, 2006).

Las concentraciones de persina en los tejidos de aguacate, son reguladas por la actividad de la enzima lipoxigenasa. Esta enzima es la responsable de la oxidación del dieno de la molécula, lo que causa decrementos en los niveles de persina durante la maduración del fruto, dependiente del incremento en la actividad de la lipoxigenasa (Rodríguez-Saona y Rumble, 2000).



(+)-(Z,Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-12,15-heneicosadien-4-ona

FM = C₂₃H₄₀O₄

PM = 380.57 [g/mol]

Figura 4. Estructura molecular de Persina.

A la persina se le reporta como un compuesto con una amplia actividad biológica, Prusky y col. en 1982 la reportan como un dieno con actividad antifúngica, presente en fruto de aguacate, específicamente contra *Colletotrichum gloeosporioides*, hongo causante de la enfermedad conocida como antracnosis. En 1995 un grupo de australianos reportan a la persina como un compuesto citotóxico, además encontraron que dosis administradas a ratones lactantes de 60-100 mg/k de hoja de aguacate producen mastitis no infecciosa. Mientras que dosis de persina de 100 mg/k provocan necrosis en el miocardio y dosis de 200 mg/k son fatales. Además encuentran similitudes estructurales de la persina con las acetogeninas de anonáceas y es a partir de estas investigaciones, que a la persina se le considera una acetogenina (Oelrichs *et al.*, 1995).

Rodríguez-Saona y col. (1997), demostraron el efecto de persina en el lepidóptero *Spodoptera exigua*, observando efectos inhibitorios en el crecimiento de larvas y en la alimentación en concentraciones de 200 µg/g y 400 µg/g en la dieta respectivamente. Persina mostró efecto insecticida contra *S. exigua* en niveles muy por debajo a los que se encuentra en los idioblastos del mesocarpio de fruto maduro (Kobiler *et al.*, 1993).

2.4.1. Actividad citotóxica de persina

Más recientemente, Butt y col. (2006) reportaron a la persina como un compuesto citotóxico, específicamente contra líneas celulares de cáncer de mama como la MCF-7, T-47D, MDA-MB-361 y la SK-Br3. El mecanismo de acción de persina en estas líneas celulares, se propone que selectivamente induce un arresto en el ciclo celular en la fase G2/M concluyendo en apoptosis dependiente de caspasas. En células MCF-7 tratadas con persina hay similitudes de que induce, como los taxanos, la inhibición de microtúbulos, por lo que se hipotetiza que persina puede tener un modo de acción similar. Los taxanos tienen su efecto citotóxico al unirse a la tubulina y desestabilizan la formación de microtúbulos, resultando en la formación de aglomerados de éstos con un subsecuente arresto mitótico, concluyendo en apoptosis celular. Se ha demostrado que la persina en células sensibles induce una agrupación de microtúbulos, similar a la que se ha mostrado con paclitaxel, otro compuesto anticancerígeno, el cual induce a la polimerización de la tubulina (Butt *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante determinar si el aguacate “criollo mexicano” contiene acetogeninas, en particular persina, en que parte de la planta se presenta el mayor contenido y si éste varía entre los genotipos y con la fenología de la planta.

Así mismo, es importante determinar si los extractos de aguacate “criollo mexicano” presentan actividad citotóxica, y relacionarlo con la presencia de acetogeninas o persina.

OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de persina en hojas y tallos de aguacate criollo mexicano, así como su variación fenológica y su actividad citotóxica.

4.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de persina y el contenido en hoja y tallo en diferentes genotipos de aguacate criollo mexicano.
2. Evaluar la variación fenológica de persina en tres genotipos de aguacate criollo mexicano.
3. Evaluar la actividad citotóxica de un extracto de aguacate criollo mexicano con alto contenido de persina, en la línea celular cancerosa de mama MCF-7.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1. Genotipos de aguacate

Para la realización de este proyecto se colectaron hojas y tallos de tres diferentes genotipos de aguacate criollo mexicano *P. americana* Mill. var. *drymifolia*, los cuales provienen de distintos lugares de la zona aguacatera michoacana (Ziracuaretiro, Uruapan y Tingambato) y de un genotipo de aguacate criollo guatemalteco *P. americana* Mill. var. *guatemalensis*, los cuales fueron colectados en la Cd. de Uruapan, Mich. en el banco de germoplasma perteneciente al INIFAP, el cual se encuentra a una altitud de 1770 msnm y a una latitud N 19° 25' 53''; O 102° 05'36''. Los 3 genotipos de la variedad mexicana han sido caracterizados molecularmente y ubicados taxonómicamente como criollos mexicanos (Rincón Hernández, 2009). El genotipo de *P. americana* Mill. cv. Hass fue colectado en la localidad de Tingambato, Mich. a una altitud de 2000 msnm, éste se encuentra en la latitud N 19° 29' 51''; O 101° 53'26''. Estos dos últimos genotipos se utilizaron como controles de comparación con el aguacate criollo mexicano.

5.1.2. Línea celular

Se utilizó la línea celular MCF-7 (HTB 22) para medir el efecto citotóxico del extracto de aguacate con mayor contenido de persina, así como de sus fracciones. Esta línea celular es derivada de un adenocarcinoma de glándula mamaria, obtenida por efusión pleural. Tienen una morfología epitelial adherente y su crecimiento es dependiente de estrógenos. La línea celular se mantiene bajo cultivo en el medio nutritivo F12K (SIGMA) adicionado con suero fetal bovino al 10% a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se realizaron cuatro colectas de material durante el año 2009, correspondientes a distintas etapas fenológicas de la planta: Colecta 1, febrero (floración); Colecta 2, Mayo (fructificación); Colecta 3, Agosto (maduración de frutos); Colecta 4, Noviembre (Defoliación).

Todas las colectas se realizaron de ramas jóvenes apicales, de las cuales se separaron las hojas y los tallos (de ramas), para posteriormente ser sometidos a secado a la sombra a temperatura ambiente durante 8 días. Previo la extracción, cada muestra fue pulverizada en seco. La obtención de los extractos se llevó a cabo por maceración utilizando como solvente la mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v:v) (Oelrichs *et al.*, 1995).

Por cada 100 mg (peso seco) tanto de hoja como de tallo y por separado, se adicionó un volumen de 25 mL del sistema de solventes, permitiendo la maceración en agitación constante (100 rpm) bajo condiciones de oscuridad durante 72 h. Después cada uno de los extractos se filtraron y se llevaron a sequedad en rotavapor al vacío a 50 °C. Por cada mg de biomasa obtenida, se adicionó 1 mL de hexano para su disolución y se colocaron en viales para cromatografía, almacenándolos a -20°C hasta su análisis.

5.3. IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PERSINA

5.3.1. Cromatografía de capa fina

Para llevar a cabo el fraccionamiento del extracto de aguacate, con la finalidad de purificar la persina y analizar su efecto citotóxico, se realizó la técnica de cromatografía de capa fina, en la cual se utilizó como fase estacionaria, placas de gel de sílice de 20 x 20 cm y como fase móvil la mezcla de solventes en orden de polaridad ascendente (Hexano/Acetato de Etilo/ Metanol 60:40:1, v/v), método basado en lo reportado por Oelrichs y col. (1995). Para la separación de fracciones, se aplicó un volumen de 1mL de extracto de aguacate criollo mexicano, el de mayor contenido de persina. Una vez

obtenido el corrimiento en placa, se observó de manera visual y mediante luz UV (254 nm), marcando el número de bandas, las cuales fueron raspadas y eluidas con el solvente de extracción (Cloroformo/Metanol 2:1, v/v), dejándose en agitación continua durante 48 h (oscuridad), para posteriormente ser evaporadas a sequedad en rotavapor a 50°C. La biomasa obtenida de este procedimiento se disolvió en DMSO al 5% y se llevó a peso constante hasta obtener una concentración de 1 mg/mL. Cada una de las fracciones fue analizada por CG-EM y en los ensayos de citotoxicidad, probándolas ante la línea celular MCF-7.

5.3.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Para establecer un método práctico de identificación de persina, se analizaron los extractos de los diferentes genotipos de aguacate y las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina. Para ello, la cromatografía de gases se realizó utilizando un cromatógrafo 6850 series II, con detector de masas 5973 de la marca Agilent Technologies. Se utilizó una columna HP-5MS, con una longitud de 30 m y un diámetro interno de 20 mm con 0.25µm de film. La temperatura inicial del horno fue de 150°C por 3 minutos, con un incremento gradual de 5°C por minuto hasta 278°C, mantenida por 12 minutos (tiempo total de 40.6 min) con una postcorrida a 300°C por 3 minutos. El gas acarreador fue helio a un flujo constante 1 mL/min, utilizando las siguientes condiciones del inyector: 270°C con inyección tipo Split 20-1, temperatura del detector 300°C y un volumen de inyección de 1µL. El espectro de masas se tomó a 70 eV con un rango de masas de 20 a 450. La identificación de 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/NIH2002.

Para llevar a cabo la cuantificación de persina, ésta se realizó por la técnica del uso de estándar interno, utilizando al ácido heptadecanoico (C17:0) a una concentración de 0.5 mg/mL. Para cada análisis cromatográfico se preparó una solución con el estándar interno, adicionando 10 µL de ésta por cada 90 µL de cada uno de los extractos obtenidos, de la cual se tomó 1 µL para su análisis en el cromatógrafo de gases. Una vez

obtenido los cromatogramas de los extractos, para determinar la cuantificación de persina se correlacionó el área del pico de ésta con el área del pico de estándar interno. Esto se realizó para cada uno de los extractos obtenidos de los diferentes genotipos y de las diferentes colectas de hojas y tallos de aguacate (n=3).

5.3.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Una vez identificada la persina en los extractos de aguacate criollo mexicano y seleccionada la fracción con persina con mayor pureza (enriquecida), ésta fue analizada con la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno ^1H y de carbono ^{13}C con fines de corroborar la estructura de persina. Los espectros de RMN fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury plus 400. Los espectros de hidrógeno (^1H) se obtuvieron a 400 MHz en ocho repeticiones, la ventana espectral fue de 6,000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetil sulfóxido (DMSO). El disolvente de referencia interna fue tetrametilsilano (TMS), los espectros de carbono (^{13}C) se obtuvieron a 100 MHz en 2,000 repeticiones, la ventana espectral fue de 25,000 Hz, en el disolvente utilizado de referencia fue cloroformo deuterado (CDCl_3). Todos obtenidos a temperatura ambiente.

5.4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

5.4.1. Cultivo celular

Previo el ensayo de citotoxicidad, las células MCF-7, fueron recultivadas en el medio fresco F12K cada 12 h para mantener su viabilidad, con una confluencia (número de células en diámetro determinado) del 80 al 100%. Una vez obtenida la confluencia celular deseada, se retiró el medio de cultivo de la monocapa celular por aspiración y se adicionó 1mL de suspensión de tripsina, se dejó incubar por 5 min a 37 °C con la finalidad de eliminar las uniones intracelulares entre las células y la placa de cultivo, observándose una suspensión celular en el microscopio invertido. Posteriormente ya teniendo la suspensión celular, ésta se homogenizó con 2 mL de medio de cultivo para

inactivar a la tripsina y recuperar a las células para después transferirlas a un tubo cónico de 10 mL y nuevamente se homogenizaron. Las células fueron contadas con la cámara de Neubauer y se hicieron diluciones para obtener una densidad celular de 2×10^4 cel/mL, usando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células} = \frac{(\# \text{cél}) \times (\text{factor de dilución}) \times 10,000 \times \text{Solución Madre}}{5}$$

En donde el **# de cél** es el número de células contadas en los cinco cuadrantes, **factor de dilución** es el volumen total / volumen de la alícuota, **10,000** es el factor de volumen (Superficie x profundidad), la **solución madre** = es el número de milímetros de la solución madre y **5** número de cuadrantes contados.

Para el ensayo de citotoxicidad, se inocularon 2×10^4 cel/mL en 90 μ L de medio de cultivo, se asignaron cinco pozas para cada tratamiento. Como tratamiento fueron aplicados el extracto de aguacate criollo con mayor contenido de persina y las 7 fracciones separadas por cromatografía en capa fina. En cada poza se adicionaron 10 μ L del extracto de aguacate o cada una de las fracciones de éste, disueltos en DMSO al 5%. En un primero experimento se aplicaron las concentraciones de 0 y 10 μ g, tanto de extracto como de las fracciones, y para el segundo experimento la aplicación fue de 0, 10 y 20 μ g. Esto se realizó en placas de 96 pozas y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Como controles negativos se usaron el medio de cultivo y el DMSO al 5%. La viabilidad celular fue determinada las 24, 48 y 72 h, mediante el método de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Monks *et al.*, 2002).

5.4.2. Método MTT

Se determinó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 h de incubación con los diferentes tratamientos aplicados, mediante el método de MTT, el cual tiene como propósito determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales. Este se basa en la reducción metabólica del MTT, realizada por células vivas mediante la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la cual produce un compuesto de color azul violeta (formazán). Para ello, primeramente se retiró el

tratamiento de las pozas y se agregan 100 μ L de medio s/suero, para después adicionar 10 μ L de MTT (5 mg/mL en PBS), las cuales se incubaron durante 4 h a 37°C. Posteriormente se añadió 100 μ L de SDS al 10 % para disolver los cristales de MTT y lisar las células, se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbencia a 550 nm en el espectrofotómetro para placas Elisa.

La cuantificación de viabilidad con MTT es un método colorimétrico, también llamado test de la inhibición de la succinato deshidrogenasa, en el cual se mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables y que se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT, las células se lisan y se solubiliza el formazán con DMSO. La absorbencia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.

Una vez obtenidas las lecturas con el espectrofotómetro, se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular de cada muestra con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{D.O. (550nm)} - \text{D.O. CN muestra} \times 100}{\text{D.O. del Control (550 nm)} - \text{D.O. CN}}$$

En donde **D.O. (550nm)** es la densidad óptica de las células tratadas con el extracto y las fracciones de este, la **D.O. del control (550nm)** es la densidad óptica de las células en las que se adicionó el 5 % de DMSO y **D.O. C.N. (550nm)** es la densidad óptica de las pozas con medio de cultivo únicamente.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (Duncan), para el cual se utilizó el programa Statistica 7, utilizando una $\alpha = 0.01$.

6. RESULTADOS

6.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PERSINA

Para la identificación de persina en los extractos de aguacate, el extracto crudo de hoja de aguacate cultivar Hass fue analizado por CG-EM, previo a un análisis de espectro de masas de cada pico del cromatograma típico, se evidenció la presencia de la molécula de persina en un tiempo de retención de 17.13 min. En la figura 5 se muestran los cromatogramas típicos de los extractos de aguacate Hass (Figura 5A) y de aguacate criollo mexicano (Tingambato) (Figura 5B). En éstos puede observarse un gran número de señales, correspondientes a diversos tipos de compuestos, incluso algunos igual o en mayor abundancia que la persina, de los cuales se identificaron mayormente como ácidos grasos y derivados (Cuadro 4). En la figura 6 se muestra el espectro de masas de persina, lo cual confirma su presencia en ambos genotipos de aguacate.

Con fines de comparación del tipo de compuestos de ambos extractos y del contenido de persina, se mostró la similitud en un buen número de metabolitos, aunque es importante señalar que hubo algunos que no comparten ambos genotipos de aguacate. En el extracto del genotipo Tingambato se observaron algunos metabolitos no presentes en el cultivar Hass, reportados como Dieno 1, Dieno 2 y Trieno, ya que no pudieron ser identificados con la base de datos NIST/EPA/NIH2002 (Cuadro 4). Sin embargo, mediante un análisis con los espectros de masas de uno de los dienos (Dieno 2) y el Trieno 1, pudo identificarse parcialmente su estructura química, determinando señales típicas del ácido linoleico y ácido linolénico, respectivamente (Figuras 7 y 8). En cuanto al contenido de persina, la abundancia de ésta fue mayor en el extracto del cultivar Hass que en el de la variedad mexicana.

Con la finalidad de corroborar la estructura molecular de persina, fue necesario el fraccionamiento de uno de los extractos de aguacate mediante cromatografía en capa fina, seleccionándose el del genotipo Tingambato. Cada una de las fracciones fue analizada con CG-EM, observando que la fracción 3 (F3) mostraba el mayor enriquecimiento de persina

(60% de pureza) (Figura 9), por lo que ésta fue analizada por RMN¹H y RMN¹³C obteniendo los espectros con típicas señales de la molécula de persina (Figuras 10 y 11).

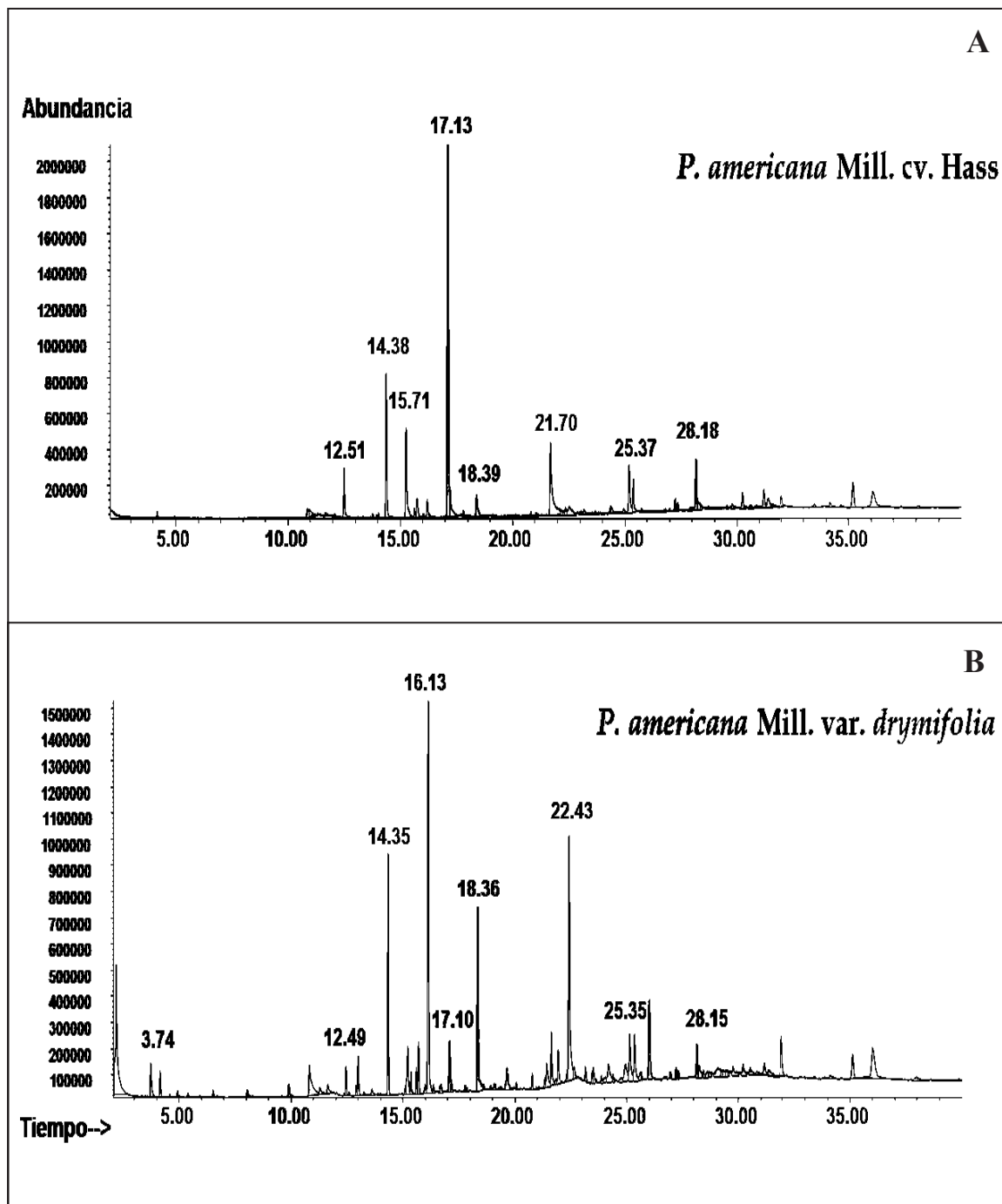


Figura 5. Cromatogramas representativos de los extractos cloroformo-metanólico (2:1) de hoja de aguacate: A) *P. americana* Mill. cv Hass; B) *P. americana* Mill var. *drymifolia*.

Cuadro 4. Contenido de compuestos lipídicos en hojas de aguacate criollo mexicano (Tingambato) y cultivar Hass.

T. R. (min)	Compuestos	Tingambato	Hass
		µg/ g peso seco	
3.7	Eugenol metil éter	96.5	N.D.
4.2	Cariofileno	65.2	22.4
12.5	Metil hexadecanoato	53.7	87.5
13.8	Etil hexadecanoato	8.8	7
15.3	Ácido 9,12-octadecadienoico	100.2	576
15.4	Dieno 1	40	N.D.
15.7	Metil 9-octadecenoato	55.9	77.1
16.1	Dieno 2	508.8	N.D.
16.2	Metil octadecanoato	N.D.	95.4
17.1	Persina	100.2	995.9
17.2	Dieno 3	11.8	Trazas
18.3	Trieno 1	283.1	75.9
25.4	Eicosano	223.4	198.2
27.2	<i>trans</i> -Escualeno	80.6	55.2
28.2	Heneicosano	136.3	140.7

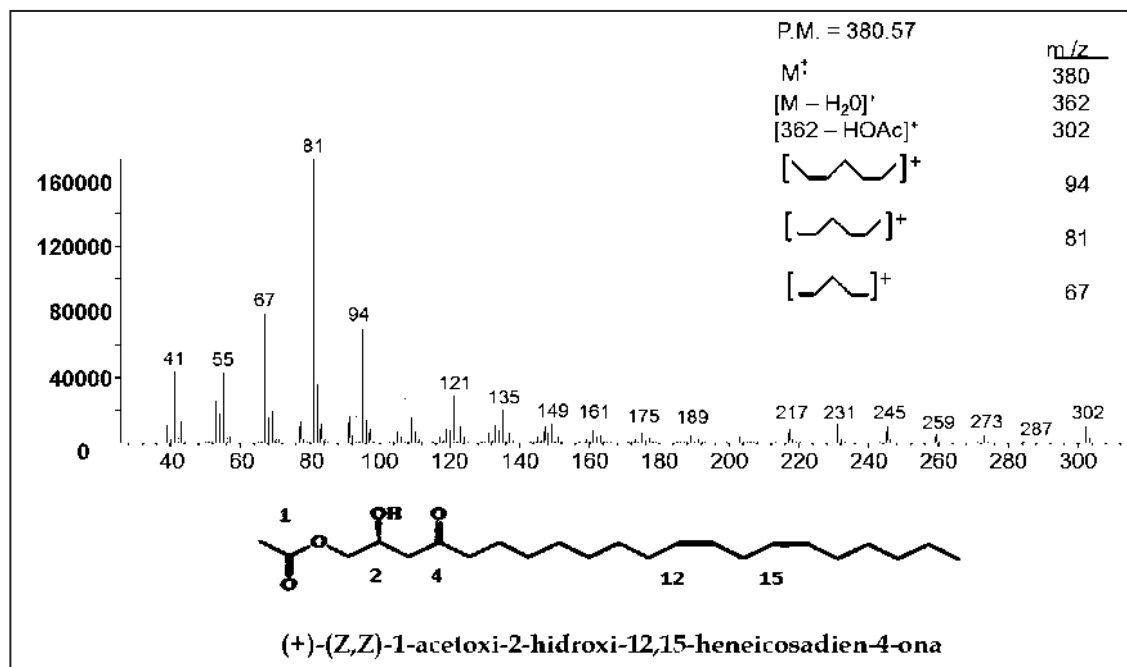


Figura 6. Espectro de masas de persina.

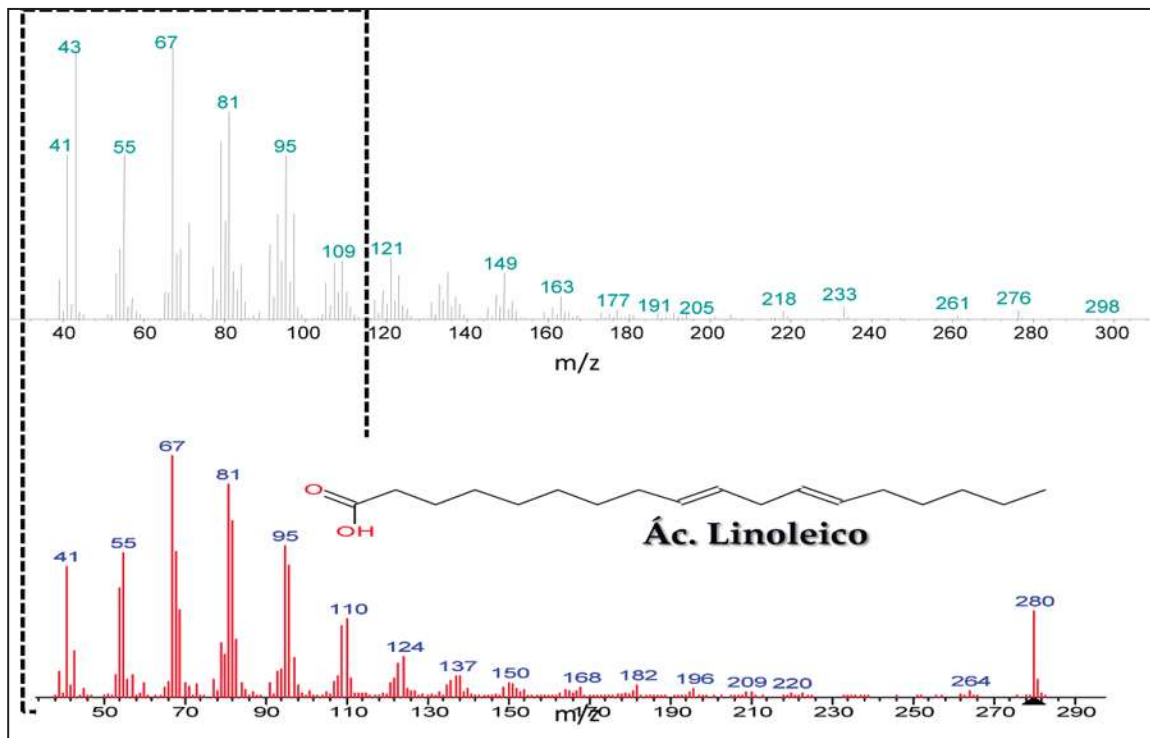


Figura 7. Comparación de los patrones de fragmentación del Diene 2 (T.R. 16.1 min) con el del ácido Linoleico.

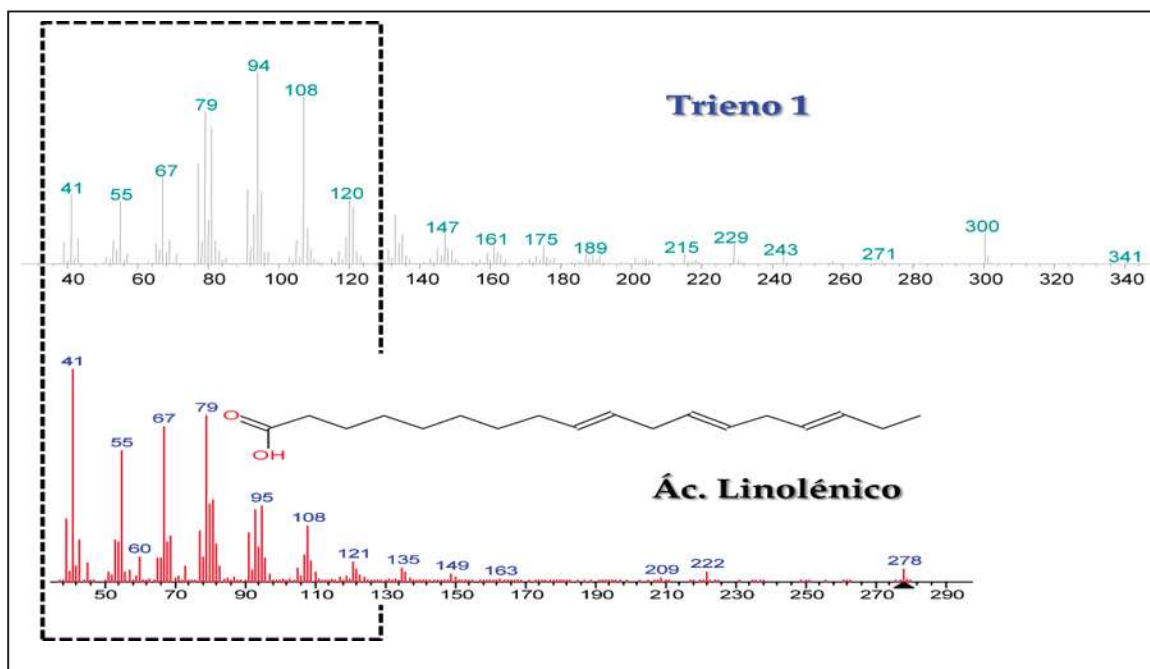


Figura 8. Comparación de los patrones de fragmentación del Trieno 1 (T.R. 18.4 min) con el del ácido Linolénico.

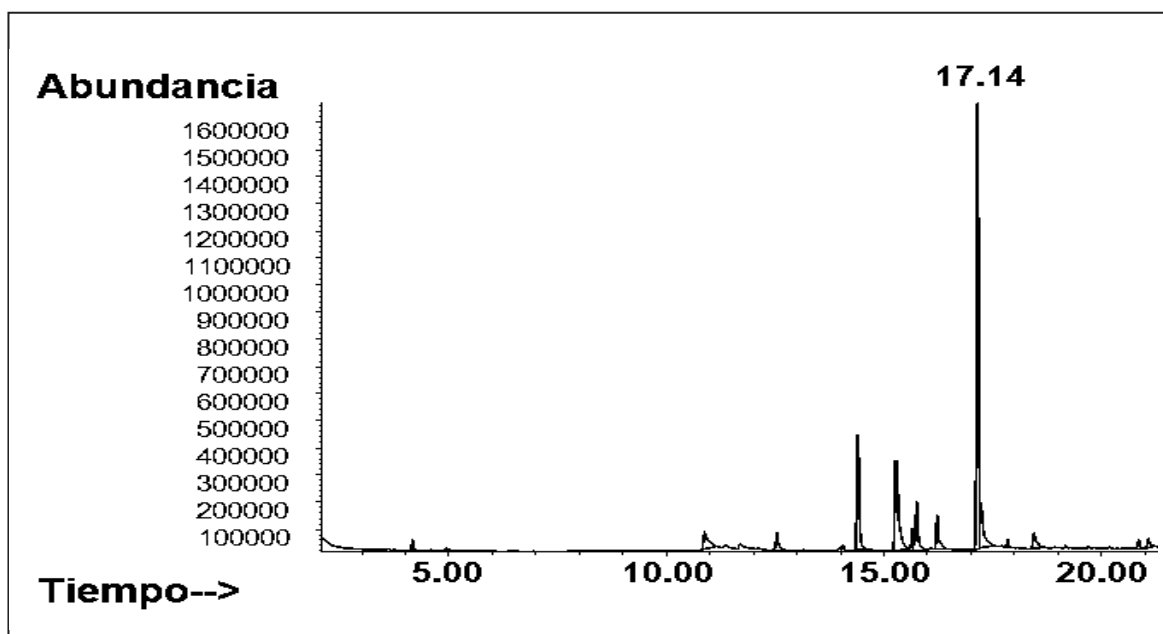


Figura 9. Cromatograma de la fracción activa (F3) del extracto cloroformo-metanólico de hoja de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato. La persina presentó un tiempo de retención de 17.14 min.

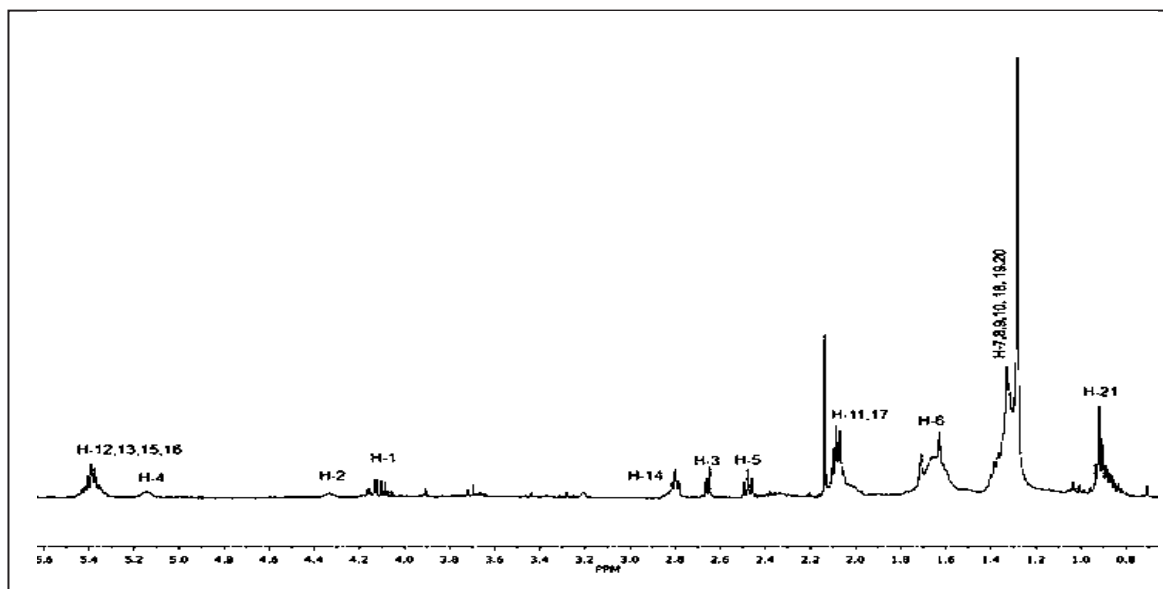


Figura 10. Espectro de RMN¹H: Desplazamiento Químico (ppm) de RMN¹H para Persina (H1 - 4.07; H2 - 4.27; H3 - 2.58 ; H4 - 5.04; H5 - 2.41; H6 - 1.54; H7 - 1.26; H8 - 1.26; H9 - 1.26; H10 - 1.26; H11 - 2.01; H12 - 5.32; H13 - 5.32; H14 - 2.73; H15 - 5.32; H16 - 5.32; H17 - 2.01; H18 - 1.26; H19 - 1.26; H20 - 1.26; H21 - 0.85).

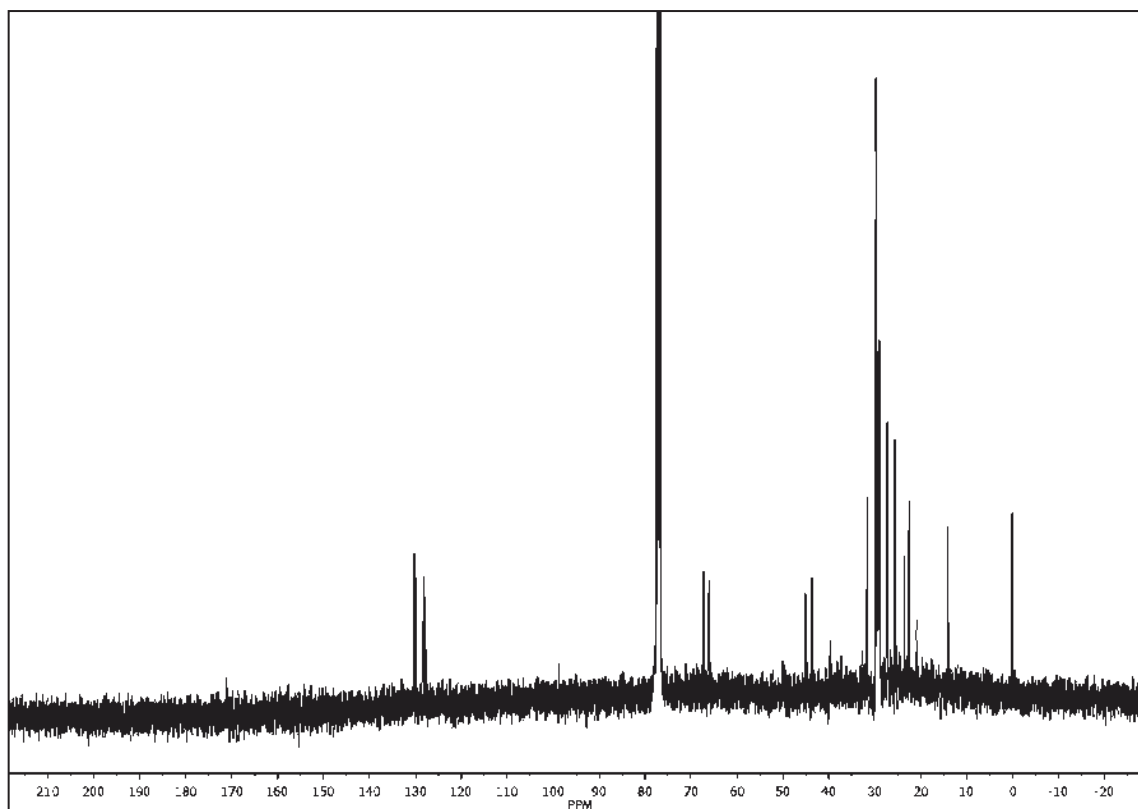


Figura 11. Espectro de RMN¹³C (100 MHz):.

6.2. CONTENIDO DE PERSINA EN AGUACATE CRIOLLO MEXICANO

Con la determinación del contenido de persina tanto en extractos de hoja como en los de tallo de los genotipos de aguacate, durante cuatro diferentes fases del crecimiento (floración, fructificación, maduración y defoliación), pudo observarse una variación en el contenido de persina entre los genotipos, en la parte de la planta y durante el desarrollo de las plantas. En el cuadro 5 se presentan los resultados del contenido de persina en hojas de cada uno de los genotipos de aguacate criollo mexicano durante las cuatro colectas, donde puede observarse que en los genotipos Tingambato y Uruapan hubo mayor cantidad de persina durante todo el año, con un máximo de 162.8 µg persina/g peso seco en la colecta 2, correspondiente al mes de mayo, cuando la planta está iniciando el desarrollo de frutos,

con un valor estadísticamente igual en hojas del genotipo Uruapan, con 163.2 μg persina/g peso seco, pero en el mes de agosto, etapa de la maduración de los frutos.

En el genotipo Ziracuaretiro, la cantidad de persina fue menor, pero el valor más alto se mostró también durante la etapa de maduración de frutos, con 96.1 μg persina/g peso seco, valor con diferencia significativa a los otros dos genotipos. En los tres genotipos se determinó que los niveles más bajos de persina se dan en el mes de febrero, durante el inicio de la floración (Cuadro 5).

Al analizar los datos del contenido de persina en los extractos de tallo de los genotipos Tingambato y Uruapan, pudieron observarse bajas cantidades en comparación con lo obtenido en hojas, sin embargo, en los extractos de tallo del genotipo Ziracuaretiro, el contenido de persina fue similar al mostrado en hojas pero de los otros dos genotipos, en la etapa de maduración de los frutos (Cuadro 6). El valor máximo de persina en tallo del genotipo Ziracuaretiro (168.1 μg persina/g peso seco) mostró diferencia significativa a los demás resultados, aunque puede observarse que los niveles de persina durante el año siempre son mayores a 100 μg persina/g peso seco, a excepción de la colecta 1 (febrero), cuando la planta está en floración, donde se cuantificó el valor más bajo de persina en este genotipo (71.7 μg persina/g peso seco) (Cuadro 6).

La cantidad de persina observada en hojas y tallos de aguacate cultivar Hass fue de 1595 μg persina/g peso seco y 825 μg persina/g peso seco, respectivamente, acumulada en la época de maduración de los frutos (Colecta 3).

Estos valores son más de 9 veces que el contenido de persina en los genotipos criollos mexicanos. Sin embargo, también se cuantificó el contenido de persina en hojas y tallos del aguacate variedad *guatemalensis*, encontrando niveles por debajo que los encontrados en los aguacates criollo mexicanos, con 16 μg persina/g peso seco en hoja y 5 μg persina/g peso seco en tallo.

Cuadro 5. Contenido de persina ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en extracto clorofórmico-metanólico de hoja de genotipos de aguacate criollo mexicano, durante 4 colectas.

Genotipo	Colecta 1	Colecta 2	Colecta 3	Colecta 4
	Febrero	Mayo	Agosto	Noviembre
	μg Persina / g peso seco			
Tingambato	40.6 a	162.8 d	83.6 ab	95.3 bc
Uruapan	67.3 ab	98.9 bc	163.2 d	136.6 cd
Ziracuaretiro	33.9 a	56.9 ab	96.1 bc	37.9 a

Letras diferentes denotan diferencia significativa ANOVA multifactorial (Genotipo * Colecta) (Duncan, $\alpha=0.01$; $n=3$).

Cuadro 6. Contenido de persina ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en extracto clorofórmico-metanólico de hoja de genotipos de aguacate criollo mexicano, durante 4 colectas.

Genotipo	Colecta 1	Colecta 2	Colecta 3	Colecta 4
	Febrero	Mayo	Agosto	Noviembre
	μg Persina / g peso seco			
Tingambato	16.9 a	6.2 a	5.2 a	4.0 a
Uruapan	0.9 a	7.4 a	13.8 a	9.5 a
Ziracuaretiro	71.7 b	115.8 c	168.1 d	137.3 c

Letras diferentes denotan diferencia significativa ANOVA multifactorial (Genotipo * Colecta) (Duncan, $\alpha=0.01$; $n=3$).

6.3. EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO DE AGUACATE CRIOLLO

Con fines de determinar el efecto citotóxico de los extractos de aguacate criollo mexicano, sobre la línea celular cancerosa de mama MCF-7, el extracto de hoja del genotipo Tingambato, uno con el mayor contenido de persina, y fracciones derivadas de éste, fueron probados en los bioensayos.

En un primer experimento, se probó el extracto y cada una de las fracciones, utilizando una concentración de 10 μg , sobre la línea celular MCF-7, determinando un efecto citotóxico muy marcado con el extracto de hoja del genotipo Tingambato, el cual ejerció un 88% de mortalidad, ya que se obtuvo 22% de células viables. Las fracciones 1, 3 y 6 (F1, F3 y F6), de este extracto, mostraron porcentajes de viabilidad similares al ejercido por el extracto, con un 25%, 22% y 22%, respectivamente, considerándolas como las más activas a las 48 h del cultivo (Figura 12A).

Posteriormente se probaron dos concentraciones del extracto y las fracciones más activas (F1, F3 y F6) (10 y 20 μg), fortaleciendo los resultados anteriores pero confirmando que a mayor concentración del extracto (20 μg), la viabilidad producida es aún más baja, alcanzando valores de 20% de viabilidad. La F3 a esta concentración, produjo el efecto citotóxico más alto con una viabilidad del 10% (Figura 12B). El comportamiento de la concentración mayor con las fracciones F1 y F2 no fue aditivo, manteniendo valores de porcentajes de viabilidad similar.

En la figura 13 se resume el resultado del efecto citotóxico del extracto cloroformo-metanólico de hojas de aguacate criollo genotipo Tingambato y de las fracciones con mayor citotoxicidad (F1, F3 y F6), en las dos concentraciones probadas (10 y 20 μg), a las 48 horas del cultivo. Puede observarse el comportamiento de citotoxicidad dependiendo de la concentración, sobresaliendo el efecto que ejerce F3 sobre las células MCF-7, ya que producen hasta un 10% de viabilidad con la concentración de 20 μg . Este resultado corrobora que F3, la más enriquecida con persina, fue la de mayor citotoxicidad sobre la línea celular MCF-7.

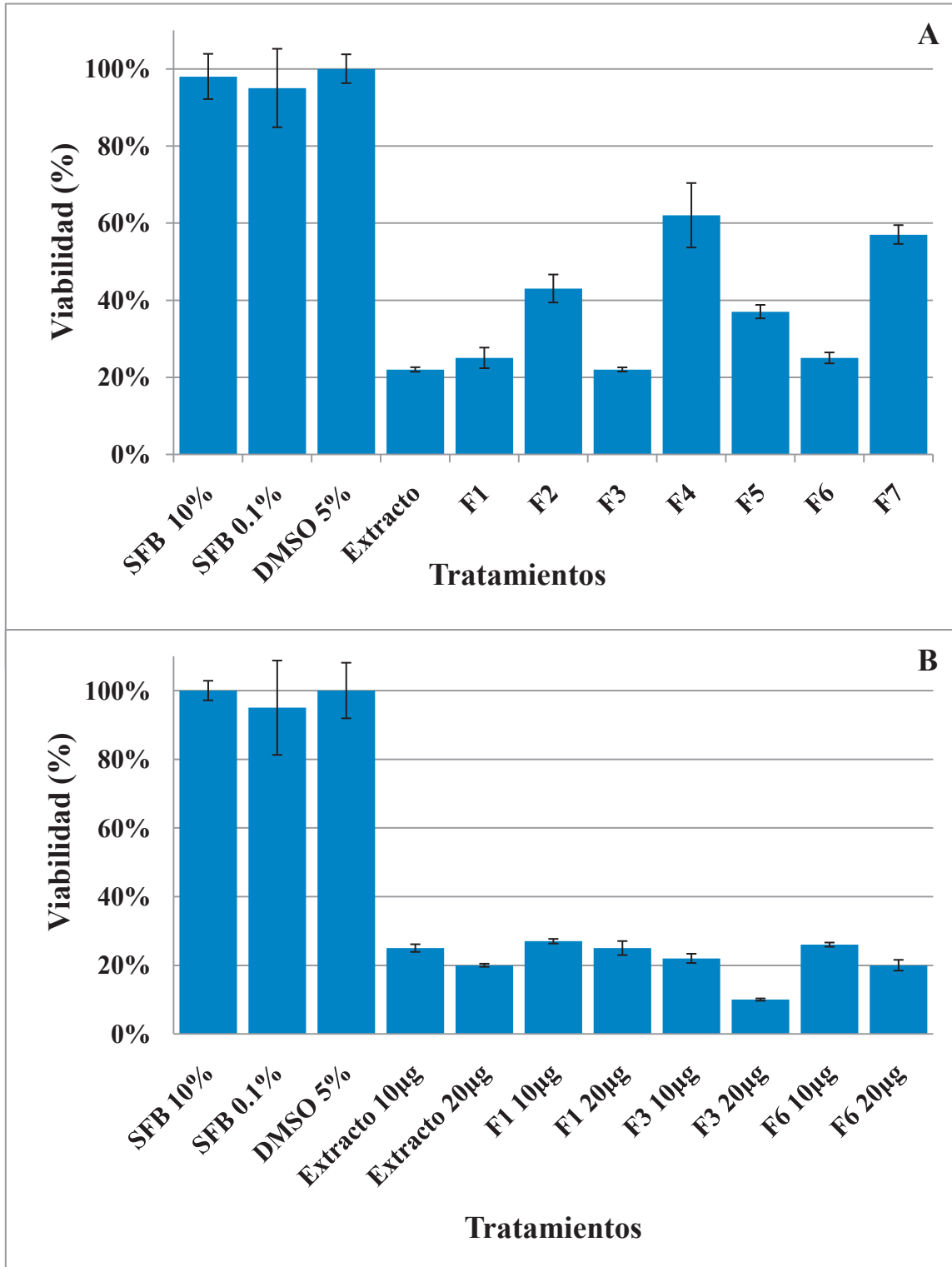


Figura 12. Porcentaje de viabilidad sobre la línea celular MCF-7 del extracto de hoja de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato y de las fracciones de éste: A) 10 µg; B) 10 y 20 µg. A las 48 h del cultivo.

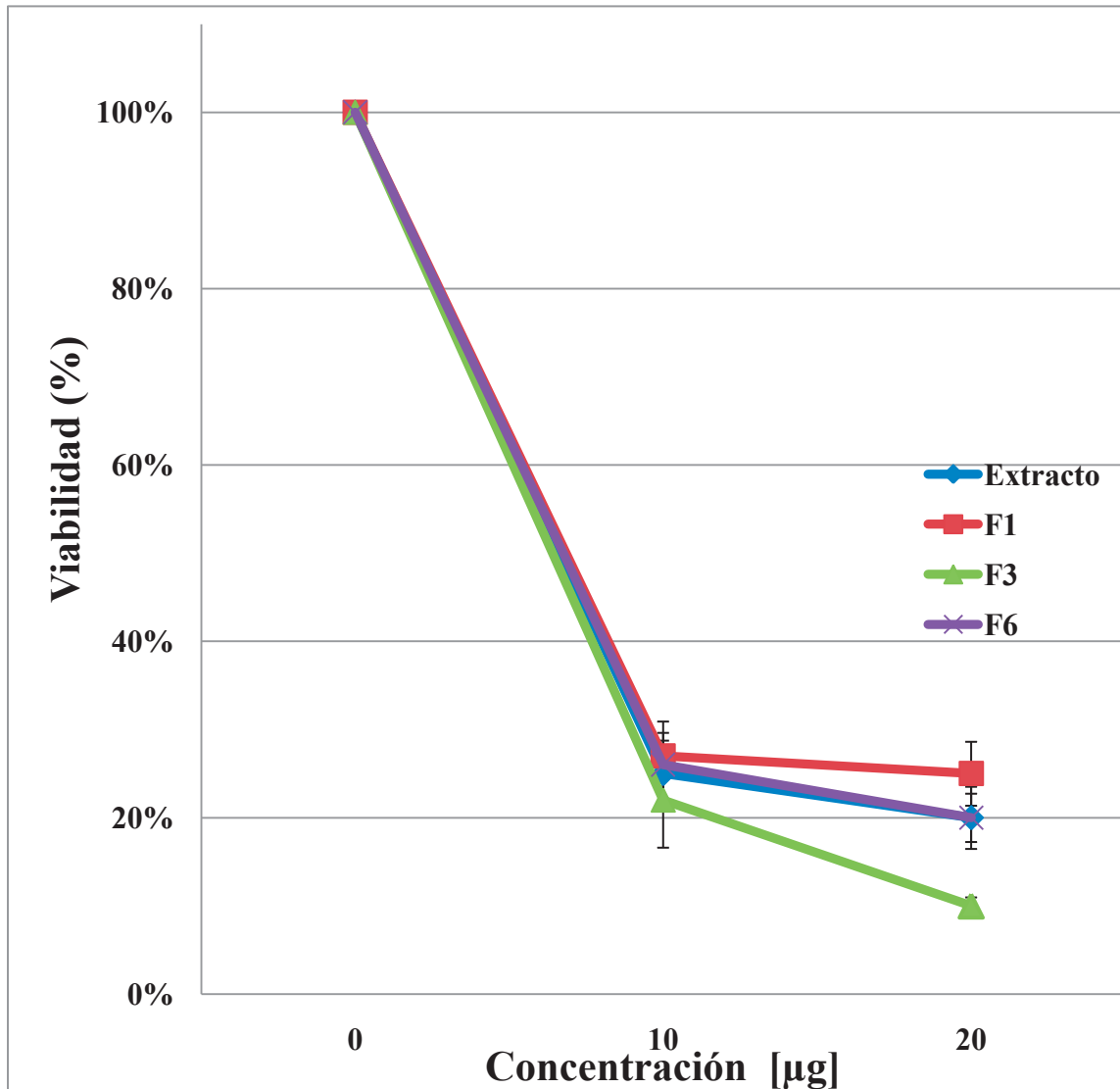


Figura 13. Porcentaje de viabilidad sobre la línea celular MCF-7 del extracto de hoja de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato y de las fracciones F1, F3 y F6, a las 48 h del cultivo.

7. DISCUSIÓN

7.1. CONTENIDO DE PERSINA EN AGUACATE CRIOLLO MEXICANO

7.1.1. Identificación de persina

Para la identificación y cuantificación de persina, la acetogenina principal de *Persea americana* Mill., primeramente se realizó el método de extracción reportado por Oelrichs y col. (1995), y los extractos fueron sometidos a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), utilizando condiciones de corrida para compuestos derivados de ácidos grasos, naturaleza química de la persina. Lo anterior fue debido a que no hay un reporte que indicara un protocolo para la identificación de persina por este método y no existen espectros de masas en la base de datos NIST, de este compuesto y algunos de sus derivados como isopersina.

Por ello, el establecimiento de un protocolo de identificación de persina por CG-EM fue necesario, primero para determinar su presencia en aguacate criollo mexicano y segundo, para cuantificar su contenido en los extractos cloroformo-metanol tanto de hojas como de tallos de los diferentes genotipos de aguacate criollo mexicano utilizados en esta investigación, así como en diferentes etapas fenológicas de las plantas.

Para la validación del método de identificación de persina por CG-EM, se analizó el espectro de masas obtenido (Figura 6), dando como resultado las señales m/z correspondiente a los diferentes fragmentos de la molécula de persina, como los característicos de los dobles enlaces (dieno), dando las señales m/z de 67, 81 y 94. Debido a la técnica empleada, por la fuente de ionización, no se observó la señal del ión molecular de persina, correspondiente a un PM de 380.57, ya que hay primeramente una pérdida de una molécula de H_2O (m/z 362) y posteriormente pierde el grupo acetilo (HOAc) (m/z 302), resultando este ión molecular (Figura 6). Asimismo, mediante el fraccionamiento del extracto del genotipo Tingambato, se logró obtener una fracción enriquecida con persina (F3, Figura 9), la cual al ser analizada por RMN¹H y RMN¹³C, se corroboró la estructura

de la persina (Figuras 10 y 11), señales que coinciden con lo reportado para esta molécula (Seawright *et al.*, 2000; Butt *et al.*, 2006). Con estos resultados se demostró que la persina está presente en aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*).

Además de la persina, pudieron ser identificados otros componentes de los extractos, todos ellos de naturaleza lipídica, encontrando variación en el contenido de éstos entre el extracto de hoja de aguacate cultivar Hass y el de criollo mexicano genotipo Tingambato. Se determinó la presencia de otros compuestos de naturaleza química similar a persina, tres moléculas de cadena larga con dos dobles enlaces (dienos) y una con tres dobles enlaces (trienos), no pudiendo ser identificados ya que no correspondieron a alguna estructura de la base de datos NIST, clasificados como dieno 1, dieno 2, dieno 3 y trieno 1, respectivamente (Figura 5, Cuadro 4). Los dienos 1 y 2 fueron exclusivos del extracto de hoja de aguacate criollo mexicano, el dieno 3 solo se encontró en trazas en el cultivar Hass y el trieno 1, aunque está en los dos extractos, en el del criollo mexicano su contenido es mayor (283.1 µg/g peso seco). Esta última molécula y el dieno 2 (508.8 µg/g peso seco) se observaron en una concentración mayor que persina (Cuadro 4).

Este tipo de moléculas en aguacate han sido reportadas principalmente como constituyentes de los frutos (Oberlies *et al.*, 1995) y hojas (Carman y Handley, 1999), se reportan como compuestos derivados del metabolismo de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico (Kashman *et al.*, 1969).

7.1.2. Variación en el contenido de persina

Los resultados del contenido de persina en los diferentes extractos analizados, demuestran muy poca variación entre los genotipos criollos mexicanos, pero si una variación entre hoja y tallo. En los genotipos Tingambato y Uruapan, el mayor contenido fue en hoja, con un contenido de persina similar entre ellos, lo cual difiere a lo observado en el genotipo Ziracuaretiro, en el cual hubo mayor contenido en persina en tallo. En cuanto a la variación fenológica, los resultados demuestran un variación en el contenido de persina en hojas de Tingambato y Uruapan o en tallos de Ziracuaretiro, dependiente de la fase de desarrollo de

las plantas, coincidiendo con una menor cantidad en la etapa de floración (colecta 1, Febrero) y mayor contenido en las etapas de desarrollo de fruto y maduración (colectas 2 y 3, fructificación y maduración) (Cuadros 5 y 6).

Tanto los niveles de persina como el dieno 2 y trieno 1 presentaron variación fenológica, ya que en las colectas de los diferentes extractos, pudieron determinarse cambios en el contenido de dichas moléculas. En la figura 14 se ejemplifica mediante cromatogramas dicha variación, reforzando que en la etapa de desarrollo y maduración de frutos, estos compuestos están en su nivel más alto.

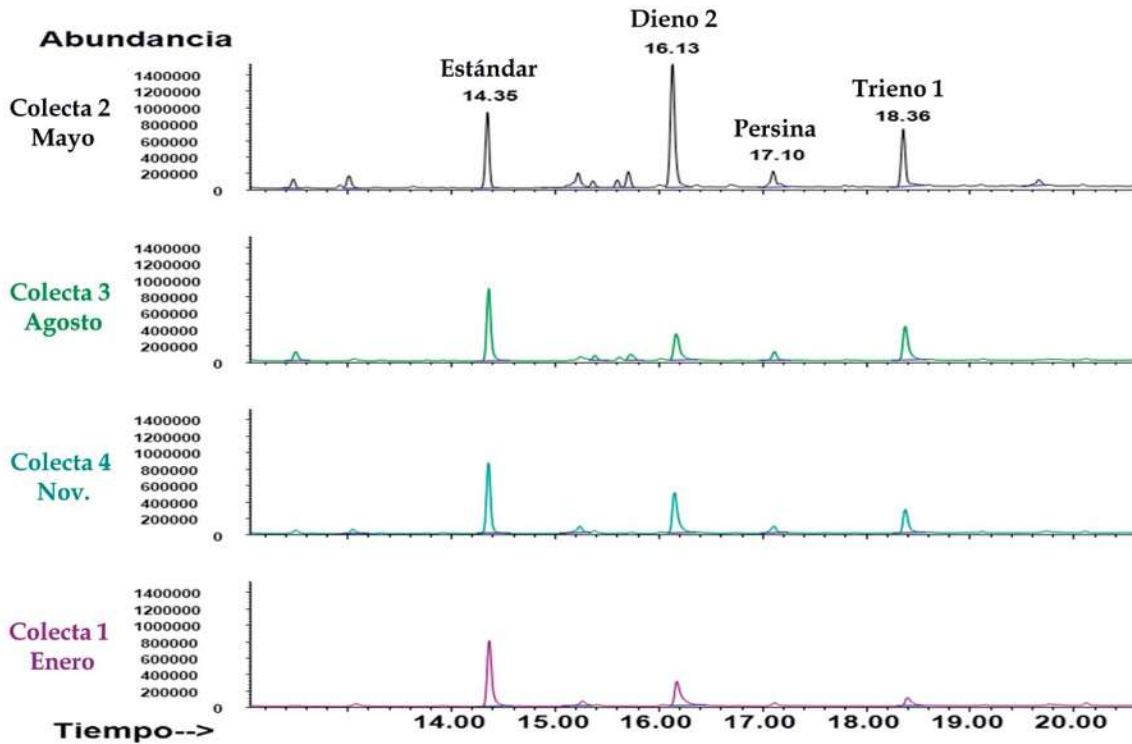


Figura 14. Esquema de la variación fenológica del contenido de persina y compuestos relacionados, en hojas de aguacate criollo mexicano genotipo Tingambato.

La variación fenológica de metabolitos secundarios no es exclusiva de compuestos volátiles, los cuales varían de acuerdo al estado fenológico de la planta, a las condiciones ambientales, a la altitud, a la procedencia y entre los diversos genotipos (Mohammadreza, 2008); también se ha observado esta variación en el contenido de acetogeninas de la familia Annonaceae (Zhe Ming Gu *et al.*, 1999).

En *Asimina triloba* (Anonácea), las acetogeninas bullatacina, asimisina y trilobacina tuvieron una variación dependiente de la fase de desarrollo de la planta, presentando un máximo contenido de éstas durante la fructificación (Zhe Ming Gu *et al.*, 1999), lo cual coincide con la variación de persina de acuerdo a los resultados obtenidos en aguacate criollo mexicano.

Los niveles de persina en los genotipos de aguacate criollo mexicano fueron menores a lo encontrado tanto en hojas como en tallo del cultivar Hass y mayores a los observados en los extractos del aguacate criollo guatemalteco, lo cual indica una variación genotípica, que concuerda con lo reportado por Carman y Handley (1999), quienes señalan al cultivar Hass como el de mayor contenido de persina, sobre todo en hojas.

7.2. CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO

La citotoxicidad de extractos de híbridos de aguacate (*P. americana* Mill.) en líneas celulares cancerosas, ha sido reportada desde 2006, encontrando como principio citotóxico a la persina, la cual a una concentración de 27.6 μM inhibe la división celular de la línea cancerosa de cáncer de mama (MCF-7) en un 95% (Butt *et al.*, 2006). No existen reportes de esta actividad citotóxica para extractos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), por lo que fue uno de los objetivos de la presente investigación.

El extracto de hoja del genotipo Tingambato mostró una alta citotoxicidad sobre las células de cáncer de mama (MCF-7), ya que con 10 μg y 20 μg se obtuvieron un 75% y un 80% de mortalidad, respectivamente (Figura 12). Las fracciones F1, F3 y F6, mostraron un efecto similar, aunque fue la F3 la cual ejerció el mayor efecto citotóxico, con hasta un 90% de mortalidad, a las 48 h del cultivo (Figura 13). El resultado es debido a que en dicha fracción, la persina es el compuesto mayoritario equivalente a una concentración de 25 μM , la cual se ha reportado como efectiva contra este tipo de células (Butt *et al.*, 2006). En las fracciones F1 y F6 no se detectó la presencia de persina pero si los dienos y el trieno anteriormente descritos, por lo que es posible que éstos sean los responsables de dicha actividad.

Son perspectivas de este estudio el elucidar las estructuras químicas de estos otros compuestos, para determinar si pertenecen al grupo de las acetogeninas y si también muestran actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7.

8. CONCLUSIONES

El aguacate criollo mexicano contiene persina, y su contenido varía según la parte de la planta y el estado fenológico.

Se demostró el efecto citotóxico del extracto de aguacate criollo mexicano sobre la línea celular MCF-7, debido al contenido de persina y de otros compuestos químicamente relacionados con acetogeninas.

9. LITERATURA CITADA

- Aguilar**, A. 1999. Plantas Medicinales del Sur de México. Mexico City: Guías prácticas México Desconocido.
- Alfaro**, M. 1984. Medicinal plants used in a totonac community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México, *Journal of Ethnopharmacology*, 11(2):203-221.
- Alfaro**, M. y Evangelista O. V. 1995. Catálogo de las plantas útiles de la sierra norte de Puebla. UNAM, México. 117 p.
- Aranda**, A. 2003. La materia médica en el 'Libellus de medicinalibus indorum herbis', *Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México*, XLVI: 12-17.
- Argueta**, A., Cano L. y Rodarte M. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista (1-3):1073-1074.
- Bergh**, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado society yearbook*. 76:61-75.
- Butt**, A. J., Roberts C. G., Seawrig A. A., Oelrichs B. P., MacLeod K. J., Liaw E. Y. T., Kavallaris M., Somers-Edgar, J. T., Lehrbach, M. G., Watts K. C. y Sutherland L. R. 2006. A novel plant toxin, persin, with *in vivo* activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5 (9): 2300-2309.
- Barquero**, A. 2007. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química viva* 6(2):19-35.
- Battista**, G. y Bettolo M., 1988. Natural Products as ecological mediators. *Interciencia*. (13): 224-225 pp.
- Baytelman**, B. 1992. Acerca de plantas y curanderos, INAH, México. p. 272.
- Bello-González**, 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.
- Carman**, R. M. y Handley P. M. 1999. Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. *Phytochemistry*. 50:1329-1331.
- Chang**, F. R. y Wu Y. C. 2001. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 64:925-931.

- Chiu**, H .F., Chih T. T., Hsian Y. M., Tseng C. H., Wu M. J. y Wu Y. C. 2003. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. *Biochemical Pharmacology*. 65(3):319-327.
- Daniels**, A.L., van Slambrouck S., Lee R.K., Arguello T.S., Browning J., Pullin M.J., Kornienko A. y Steelant W.F.A. 2006. Effects of extracts from two Native American plants on proliferation of human breast and colon cancer cell lines *in vitro*. *Oncology Reports* 15: 1327-1331.
- de Almeida**, A. P., Miranda M. M., Simoni I. C., Wigg M. D., Lagrota M. H. C. y Costa S. S. 1998. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytotherapy Research*, 12:562–567.
- de Souza**, L. J. 2006. Estudio de Plantas Bioactivas. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Pernambuco. Brasil. 233 pp.
- Domergue**, F., Helms G. L., Prusky D. y Browse J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54:183-189.
- Fang**, X., Rieser M. J., Gu Z., Zhao G. y McLaughlin J. L. 1993. Annonaceous Acetogenins: An Updated Review. *Phytochemical Analysis*, 4:27-48.
- Farfán**, H. B. 2001. Aspectos ecológicos y etnobotánicas de los recursos vegetales de la comunidad Mazahua Francisco Serrato, municipio de Zitácuaro, Michoacán, México. Tesis Prof., Fac. de Biología, UMSNH, Morelia, Michoacán, 137 pp.
- García-Aguirre**, K., Ramón-Gallegos E., Madrigal-Bujaidar E. y Zepeda L. G. 2006. Evaluación citotóxica *in vitro* de acetogeninas aisladas de *Annona cherimolia* Mill. 2º Congreso Nacional de Química Médica.
- Gispert-Cruells**, M. y Rodríguez G.H. 1998. Los Coras, plantas alimentarias y medicinales de su ambiente natural. Edit. , D.F. 1ª. Ed. 73 p.
- Gionaetto**, F. y Blas M. 2000. Etnobotánica de la meseta P'urépecha, CRIC, Roma.
- Gleye**, C., Akendengue B., Laurens A. y Hocquemiller R. 2001. Coronin from roots of *Annona muricata*, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis. *Planta Medica*,67:570-572.
- Granda**, M., Fuentes V., Acosta L. y Cabrera L. 1988. Sustancias biológicamente activas. En plantas medicinales I. CIDA, La Habana. 4-7 pp.
- Gupta**, M. 1995. Plantas medicinales iberoamericanas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED. p. 201.

- Hartmann, T.** 2004. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case-study in chemical ecology. *Planta* 219:1-4.
- Hersch, P.** 1999. De hierbas y herbolarios en el México actual. *Arqueología Mexicana*. Vol. VII. Num. 39.
- Huerta, C.** 2001. La Herbolaria, mito o realidad. *Biodiversitas*. Comisión Nacional para el conocimiento u uso de la biodiversidad. México. 3 (12):1-7.
- Huerta, C.** 2002. La herbolaria: mito o realidad. *in* www.conabio.gob.mx Julio 2010.
- Jolad, S. D., Hoffmann J. J., Schram K. H., Cole J. R., Tempesta M. S., Kriek G. R. y Bates R.B.** 1982. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *The Journal of Organic Chemistry* 47 (16):3151-3153.
- Kashman, Y., Neeman I. y Lifshitz A.** 1969. New compounds from avocado pear. *Tetrahedron*. 25:4617-4631.
- Kim, O. K., Murakami A., Nakamura Y., Takeda N., Yoshizumi H. y Ohigashi H.** 2000. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 48:1557-63.
- Knaul, M. F., Nigenda G., Lozano R., Arreola-Ornelas H., Langer A. y Frenk J.** 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*. Vol. 51 supl 2:S335-S344.
- Kobiler, L., Prusky D., Midland S., Sims J. J. y Keen N. T.** 1993. Compartmentation of antifungal compounds in oil cells of avocado fruit mesocarp and its effect on susceptibility to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 31 9-328.
- Kumar, P.** 2004. Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Curr. Sci* 86(7):930-937.
- Linares, M. E., Bye R. y Flores B.** 1990. Tés curativos de México. Cuadernos, Instituto de Biología No.7. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal. México.
- Lozoya, X.** 1994. Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs In: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*.Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley.
- Lozoya, X. y Rivera E.** 1999. Numeralia. *Arqueología Mexicana*. 7:39 p.

- Mena-Rejon**, G., Caamal-Fuentes E., Cantillo-Ciau Z., Cedillo-Rivera R., Flores-Guido J. y Moo-Puc R. 2009. *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3):462-465.
- Mohammadreza**, V.R. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pimpinella affinis* Ledeb. Essential oil growing in Iran. *Int. J. Green Pharm.* 1 2 (3): 138-140.
- Neeman**, I., A. Lifshitz y Kashman Y. 1970. New antibacterial agent isolated from the avocado pear. *Appl. Microbiol.* 19:470-473.
- Oberlies**, N. H., Jones J. L., Corbett T. H., Fotopoulos S. S. y McLaughlin J. L. 1995. Tumor cell growth inhibition of annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Letters*, 96(1):55-62.
- Ocampo**, S. D. M. y Ocampo C. R. 2006. Bioactividad de la familia Annonaceae. *Revista Universidad de Caldas.* 135:155.
- Oelrichs**, P. B., Ng J. C., Seawright A. A., Ward A., Schaffeler L. y MacLeod J. K. 1995. Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *J. Nat. Toxins*, 3:344-349.
- Ortiz de Montellano**, B. 1993. *Medicina, salud y nutrición aztecas, Siglo XXI, México.*
- Penso**, G. 1982. Inventory of medicinal plants and compilation of a list of the most widely used plants. *Ginebra OMS (DPM/WP/78.2).*
- Pinheiro**, S. L., Boaventura D. M. A. y De Oliveira B. A. 1994. Crassiflorina, una acetogenina tetra-hidrofuranica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). *Química Nova*, 17(5)387-391.
- Platt**, K. A. y Thomson W. W. 1992. Idioblastos oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. *Int. J. Plat Sci.* 153 (3): 301-310.
- Prusky**, D., Keen N. T., Sims J. J. y Midland S. L. 1982. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotricum gloeosporoides* on unripe avocado fruits. *Phytopathology.* 72:1578-1582.
- Quispe**, M. A., Zavala C. D., Rojas C. J. Posso R. M. y Vaisberg W. A. 2006. Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 23(4):265-269.
- Ramírez**, C. 1991. *Plantas de la región náhuatl del centro de Guerrero, SEP, México.*

- Raynaud-Le, G. S.,** Fourneau C., Laurens A., Bories C., Hocquemiller R. y Loiseau P. M. 2004. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomed. Pharmacother.* 58: 388-392.
- Rieser, M. J.,** Kozlowski J., Wood F. y McLaughlin J. 1991. Muricatacin: a simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). *Tetrahedron Letters*, 32:1137-1140.
- Rivas-Galindo, V. y** Waksman N. 2001. Cytotoxic hydroxyantracenones from fruits of *Karwinskia parvifolia*. *Natural Products Letters*, 15 (4):243-251.
- Roberts, C.G.,** Gurisik E., Biden T.J., Sutherland R.L. y Butt A.J. 2007. Synergistic cytotoxicity between tamoxifen and the plant toxin persin in human breast cancer cells is dependent on Bim expression and mediated by modulation of ceramide metabolism. *Mol. Cancer Ther.* 6(10): 2777-2785.
- Robledo-Reyes, P. C.,** González R., Jaramillo I. G. y Restrepo J. 2008. Evaluación de la toxicidad de acetogeninas anonáceas sobre ninfas de *Periplaneta americana* L. (Dyctioptera:Blattidae). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 9 (1)54-61.
- Rodríguez, J., S. y** Espinoza G. J. 1995. Listado Florístico del estado de Michoacán. Sección I. Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fasc. complementario VI. Instituto de Ecología. 210 p.
- Rodríguez-Saona, C.,** Millar G. J. y Trumble T. J. 1997. Growth inhibitory, insecticidal, and feeding deterrent effects of (12z,15z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene, a compound from avocado fruit, to *Spodoptera exigua*. *Journal of Chemical Ecology*, 23 (7)1819:1831.
- Rodríguez-Saona, C.,** J. G. Millar, D. F. Maynard and Trumble J. T. 1998. Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil. *J. Chem. Ecol.* 24:867-889.
- Rodríguez-Saona, C. y** Trumble J. T. 2000. Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Curr. Org. Chem.* 4:1249-60.
- Rosales-Reyes, T.,** de la Garza M., Arias-Castro C., Rodríguez-Mendiola M., Fattel-Fazenda S., Arce-Popoca E., Hernández-García S. y Villa-Treviño S. 2008. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3):381-386.
- Rupprecht, J. K.,** Hui Y. y McLaughlin J. L. 1990. Annonaceous acetogenins: a review. *Journal of Natural Products*, 53:237-278.
- Rzedowski, J.** 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa, México, p. 432.

- Rzedowski, J.** 1991. Claves para la identificación de los Géneros de la Familia Compositae en México. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México. 5, 33, 41-43 pp.
- Salomón, G.** 1983. Plantas y medicina tradicional de Guerrero, UAG, México.
- Sánchez-Pérez, J. de la L.** 2001. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México.
- Swedlow, J. L.** 2000. Medicines in Nature. National Geographic. pp. 3-7.
- Taddei-Bringas, G., Santillana M., Romero J. y Romero M.** 1999. Aceptación y Uso de Herbolaria en Medicina Familiar. Salud Pública de México, 41(3):216-220.
- Taylor, L.** 2000. Plant based drugs and medicines. From the Raintree Nutrition Internet Web Site. <http://www.rqain.tree.com>.
- Valverde, J.** 1984. The aztec herbal of 1552. Martín de la Cruz “Libellus de medicinalibus indorum herbis”; context of sources on nahuatl materia medica. Veroff. Int. Gesch. Pharm. 53, 9-30.
- van der Werff, H. y Lorea, F.** 1997. Familia Lauraceae. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. 56:45-49.
- van Slambrouck S., Daniels A.L., Hooten C.J., Brock S.L., Jenkins AR. Ogasawara M., Baker J.M., Eerik J.A., Elias M., Agustin V.J., Constantine S.R.; Pullin M.J., Shors S.T., Kornienko A. y Steelant W.F.A.** 2007. Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells. Oncology Reports 17:1487-1492.
- Wigg, M. D., Al-Jabri A. A., Costa S. S., Race E., Bodo B. y Oxford J.S.** 1996. In vitro virucidal and virustatic anti HIV- 1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 7, 179–183.
- Xie, H. H., Wei Y. X., Wang D. J., Lui F. M. y Yang Z. R.** 2003. A New Cytotoxic Acetogenin from the Seeds of *Annona squamosa*. Chinese Chemical Letters, 14 (6):588-590.
- Zaki, A. I., Zentmyer G. A., Keen N. T. y Sims J. J.** 1973. Isolation of an antifungal substance from *Persea borbonia*. Second Int. Congr. Plant Pathol. Abstr. No. 0960.