

UNIVERSIDAD
DE ORIENTE

FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES Y EXACTAS

Evaluación química y actividad antimicrobiana de extractos elaborados de semilla de *Persea americana* Mill

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas

Autor: Ilainis Vidal Trimiño

Tutores

MSc. Silvia del Carmen Molina Bertrán

Dr. C Gabriel Llauradó Maury





Santiago de Cuba

2020

“(...)se debe llegar a disponer de los medios necesarios para combatir las enfermedades, prolongar la vida, y no tengo la menor duda de que la ciencia ayudará a que se cumpla el potencial de vida que tiene el ser humano.”

Fidel Castro

Cuando miro atrás veo que ha sido un largo viaje desde el día que nací hasta la actualidad, un camino lleno de éxitos y fracasos. En esta etapa de mi vida he enfrentado muchas cosas, algunas bellas otras no tanto. Por eso vale la pena dedicar esta tesis a las personas que siempre estuvieron para mí a pesar de mis defectos, aquellas personas especiales que siempre me han dado la esperanza y me ayudaron a reconocer que se puede lograr todo lo que nos proponamos aun cuando el miedo nos paraliza. Por todas esas razones hoy quiero dedicar este maravilloso trabajo a:

-  Mis padres Idalmis y Roberto por creer en mí, proporcionándome su amor y confianza en todo momento
-  Mis hermanos en especial Idailis y Roberkis por estar para mí siempre que los necesité
-  Mis sobrinos que los quiero con la vida
-  Mi novio Diosmeidis por su apoyo y comprensión

Para alcanzar los objetivos y metas que te propones en la vida no solo es necesario mantener de forma paralela la voluntad y la constancia, que hace que los objetivos sean perseverantes y duraderos, sino también contar con las personas adecuadas; aquellas que sean capaces de dejar una huella en tu camino. De esta sencilla forma quiero agradecer a todos los que han hecho posible el poder cumplir uno de mis sueños.

- ✚ A Dios y a la Virgen de la Caridad por brindarme la fuerza que necesitaba en los momentos difíciles
- ✚ A mis padres Idalmis y Roberto por los años de sacrificio; gracias por no derrumbarse
- ✚ A mis hermanos Idailis y Roberkis por permitirme contar con ellos en todo momento de mi vida
- ✚ A mi novio Diosmeidis por convertirse en mi compañero y amigo
- ✚ Muchas gracias a mis tutores Silvia Molina Bertrán y Gabriel Llauradó Maury por brindarme todo su apoyo, ayuda incondicional, confianza y conocimiento en la realización de este trabajo
- ✚ A mi familia, en especial a mi tía Inaldys por toda su ayuda y preocupación
- ✚ A todos los profesores y técnicos que me ayudaron a realizar los experimentos de esta investigación: Chicha y Roberto
- ✚ A mis compañeros de aula, que siempre recordaré con cariño por todo este tiempo compartido, en especial las muchachitas del cuarto, por compartir buenos y malos momentos, haberlos conocido fue una de las mejores cosas que me pasó en esta universidad
- ✚ A todos los profesores que contribuyeron en mi formación personal y académica
- ✚ A aquellos que fueron compañeros de aula: Yakira y Lili
- ✚ A mi amiga Yusnavys por su amistad incondicional y apoyo en todo momento
- ✚ En fin, deseo agradecer a todas aquellas personas que me apoyaron incondicionalmente y no me abandonaron, a los que me enseñaron que en la vida se

lucha hasta el final por lo que uno quiere y que pusieron en mí su esperanza, su confianza, su respeto para que sea una mejor persona y profesional en el futuro

Muchas Gracias

El tratamiento de enfermedades infecciosas ocupa un lugar cimero dentro de las patologías más frecuentemente tratadas con remedios herbarios. Esto, unido al uso indiscriminado de algunos antibióticos, resalta el interés en seguir explorando nuevas fuentes de metabolitos activos que exhiban potencial actividad antimicrobiana. De ahí que la presente investigación esté dirigida a Evaluar la composición química y actividad antimicrobiana de los extractos elaborados de la semilla de *Persea americana* Mill. Los extractos se obtuvieron mediante dos métodos, maceración/agitación y extracción con Soxhlet, empleando como solvente metanol y agua destilada. A los cuatro extractos se le determinaron la composición química cualitativa y cuantitativa a través de los ensayos descritos en la técnica de Tamizaje fitoquímico y ensayos específicos, respectivamente. Se evaluó el efecto de los dos extractos sobre la viabilidad de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de microdilución con resazurina. El análisis fitoquímico reveló la presencia de metabolitos como: alcaloides, cumarinas, taninos, flavonoides, azúcares y aminoácidos para todos los extractos evaluados. Se logró cuantificar las concentraciones de proteínas, carbohidratos, compuesto fenólicos y flavonoides para los cuatro extractos, siendo mayor lo detectado en los extractos metanólicos. Finalmente se demostró la influencia en la viabilidad bacteriana de los extractos metanólicos, especialmente sobre la viabilidad de *P. aeruginosa* observándose una actividad superior a la de la sustancia control.

The treatment of infectious diseases occupies a top place within the pathologies most frequently treated with herbal remedies. This, together with the indiscriminate use of some antibiotics, highlights the interest to explore new sources of active metabolites that exhibit potential antimicrobial activities. Hence, the present research is aimed to evaluate the chemical composition and antimicrobial activity of *Persea americana* Mill seed extracts. The extracts were obtained by two methods, maceration/stirring and extraction by Soxhlet, using methanol and distilled water as solvent. The qualitative and quantitative chemical compositions were determined through the tests described for the Phytochemical Screening and specific assays. The effect of the two extracts on the viability of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was evaluated by the microdilution method with resazurin. Phytochemical analysis revealed the presence of metabolites such as: alkaloids, coumarins, tannins, flavonoids, sugars and amino acids for all the extracts evaluated. Additionally, proteins, carbohydrates, phenolic compounds and flavonoides levels were quantified for all extracts, being in the methanolic extract. Finally, the influence on the bacterial viability of the methanolic extracts was demonstrated, especially on the viability of *P. aeruginosa*, observing an activity superior even compared with the reference control.

Índice

Introducción	1
Capítulo I Revisión Bibliográfica	4
I.1 Generalidades sobre los microorganismos.....	4
I.1.1 Características generales de los microorganismos utilizados.	4
I.2 Fármacos antimicrobianos.....	5
I.2.1 Principales grupos químicos de fármacos antimicrobianos y ejemplos de los mismos.....	5
I.2.2 Mecanismos de Acción de Antibacterianos.....	7
I.3 Estudios antimicrobianos.....	8
I.3.1 Generalidades	8
I.3.2 Metodologías para estudios antimicrobianos	8
I.4 <i>Persea americana</i> Mill. Generalidades	10
I.4.1 Descripción Botánica	10
I.4.2 Hábitat y zona de cultivo	11
I.4.3 Composición química.....	11
I.4.4 Propiedades medicinales	12
Capítulo II. Materiales y métodos	14
II.1 Características generales de la investigación.....	14
II.3 Obtención y procesamientos de los extractos vegetales	14
II.4 Determinación de la composición química de los extractos de semilla de <i>Persea americana</i> Mill	15
II.4.1 Determinación de la composición química cualitativa.....	15
II.4.2 Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos.....	17
II.4.2.1 Determinación de proteínas	17
II.4.2.2 Determinación de carbohidratos	18
II.4.2.3 Determinación del contenido de fenoles totales.....	18
II.4.2.2 Determinación del contenido de flavonoides.....	19



II.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	19
II.6 Procesamiento de la información	20
Capítulo III Resultados y discusión.	21
III.1. Análisis químico cualitativo de los extractos	21
III.2 Análisis químico cuantitativo de los extractos	25
III.2.1 Determinación del contenido de proteínas y carbohidratos	25
III.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales	26
III.2.4 Determinación del contenido de flavonoides	28
III.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana	29
Conclusiones	36
Recomendaciones	37
Referencias Bibliográficas	

Introducción

Las plantas constituyen un recurso valioso de los sistemas de salud de los países en desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina natural y tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos.^{1,2} Las plantas medicinales posee además importantes aplicaciones en la medicina moderna pues son fuente directa para la obtención de nuevos agentes terapéuticos y pueden ser empleadas como materia prima en fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos.^{3,4}

Actualmente diversas enfermedades son tratadas con la ayuda de productos naturales, fundamentalmente aquellas que presentan alta incidencia en la población, como las enfermedades causada por microorganismos.⁵ Las mismas poseen una amplia e importante terapia medicamentosa, siendo sin lugar a dudas el tratamiento con antimicrobianos uno de los avances científicos más importantes de la medicina del siglo XX. Pero la facilidad relativa de administración y la disponibilidad de estos fármacos han llevado a muchos a adoptar este tratamiento de forma empírica, utilizando fármacos de amplio espectro para algunas infecciones comunes; lo cual a través de los años ha provocado que la resistencia antibiótica se considere actualmente en un problema de salud mundial.⁶

Los países en vías de desarrollo muestran niveles de resistencia mayores que en países industrializados y cuentan con menos recursos para el desarrollo de estrategias que puedan facilitar su contención. En América Latina, la resistencia bacteriana se ha incrementado de manera alarmante, en los últimos años, los ingresos por infecciones bacterianas representaban el 34,6%, comparado con Europa (19,7 %) y Norte América (10 %)⁷. La estrategia trazada ha sido continuar el desarrollo de modificaciones sintéticas de antibióticos existentes para recuperar eficacia, así como la búsqueda continua de nuevos antibióticos de fuentes naturales.^{8, 9,10}



Cuba es un país con una gran diversidad en la flora de ahí que el uso de plantas medicinales con una finalidad terapéutica es muy común, para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Muchos de los productos naturales utilizados en nuestro país son derivados de plantas que han sido estudiadas y se conocen sus usos, pero también existen en la cultura popular especies vegetales que solo se usan por tradición y que aún no han sido validadas científicamente entre las cuales encontramos la *Persea americana* Mill, a la cual se le atribuyen disímiles efectos medicinales, aunque todos no han sido ampliamente estudiados.

La *Persea americana* Mill es conocida comúnmente como aguacate y pertenece a la familia Lauraceae.¹¹El aguacate es una baya con una sola semilla, muy variable en tamaño, forma y características de su corteza, pulpa y semilla. Es además muy popular por contener gran cantidad de vitaminas como la B1, B2, B6, vitamina C, A, E y minerales como potasio, magnesio, fósforo, sodio.¹²

Existen en las bibliografías estudios científicos que evidencian algunas propiedades medicinales tales como: hipolipidémica, anticonceptiva,¹¹cicatrizante,¹³antidiarréica, carminativa, diurética¹⁴ entre otras. La actividad antimicrobiana ha sido también estudiada en diferentes órganos de la planta como las hojas, fruto, cáscara.^{15, 16}

Dentro de este se encuentra las semillas que en muchas ocasiones ocupa hasta en 40% del peso del fruto y que generalmente es desechada. Actualmente existe una tendencia global al estudio y reutilización de estos productos de desecho industrial y doméstico como la semilla del aguacate, pues en muchas ocasiones pueden provocar problemas ecológicos y contaminación.¹⁷

Específicamente de la semilla de aguacate se han realizados algunos estudios que refieren a actividades farmacológicas como hipolipemiente, analgésico y antioxidante.^{18,19} En cuanto a la actividad antimicrobiana solo se reportan algunos estudios sencillos, en microorganismos específicos y que no hacen referencia a los posibles mecanismos asociados al efecto antimicrobiano.²⁰

Aunque, la planta *P. americana* Mill ha sido estudiada, existen pocos reportes sobre la actividad antimicrobiana asociada al uso de la semilla y aún más escasos son los informes de esta especie cultivada en Cuba. Una exploración acerca de las propiedades medicinales de productos derivados de los materiales de desecho del aguacate, tales como las semillas, puede conducir al diseño de nuevos suplementos nutricionales, medicamentos y productos de calidad mejorada, lo cual tendría un impacto significativo en la salud humana.

Problema científico

Insuficientes evidencias científicas acerca de la composición química y la actividad antimicrobiana de extractos derivados de semilla de *Persea americana* Mill, no permiten establecer la relación entre los metabolitos presentes y la actividad farmacológica.

Hipótesis

La determinación de la composición química y la evaluación de la propiedad antimicrobiana de los derivados de la semilla de *Persea americana* Mill, permitirán determinar la influencia de los metabolitos presente en la actividad biológica determinada.

Objetivo General

Evaluar la composición química y actividad antimicrobiana de los extractos elaborados de la semilla de *Persea americana* Mill.

Objetivos específicos:

1. Determinar la composición química cualitativa y cuantitativa de los extractos metanólicos y acuosos elaborados de la semilla de *Persea americana* Mill.
2. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos y acuosos elaborados de la semilla de *Persea americana* Mill.

Capítulo I Revisión Bibliográfica

I.1 Generalidades sobre los microorganismos

Los microorganismos están dotados de individualidad, que presentan a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. En su mayoría son unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos compuestos por células multinucleadas, o incluso multicelulares. Estos presentan múltiples formas y tamaño. Dentro de los mismos se encuentran organismos unicelulares procariotas como las bacterias, y eucariotas como los protozoos, una parte de las algas y hongos.²¹

I.1.1 Características generales de los microorganismos utilizados

- *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

Bacilos Gram-negativos rectos o curvos (bastoncillos) que pueden aparecer aislados, en pares o en cadenas, con un diámetro de 0,6 a 2 μm , aerobios, no esporulados, móviles y algunos poseen una microcápsula. Crece con facilidad en los medios de cultivos y produce, en ocasiones, un olor dulce o de uvas. Se desarrolla a temperatura entre 10 y 42 $^{\circ}\text{C}$, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37 $^{\circ}\text{C}$. Algunas cepas producen hemólisis. Las mismas emiten pigmentos de fenazina en agar nutritivo, después de 24 horas de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente a temperatura ambiente; estos pigmentos pueden ser azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorrubina) y negro (piomelanina). Existe, aproximadamente, un 10 % que son apigmentadas.

Pseudomonas aeruginosa es el patógeno más importante dentro del género *Pseudomonas*, teniendo en cuenta la cantidad y tipos de infecciones (invasivas y toxígenas) que produce, así como la morbilidad y mortalidad que ocasiona. Es necesario emplear fármacos de forma combinada, pues pueden desarrollar resistencia cuando se usan de forma única. Deben utilizarse penicilinas activas contra la misma, como: Ticarcilina, Mezlocilina, Piperacilina, combinadas con un aminoglucósido: Gentamicina, Tobramicina, Amikacina. Otros medicamentos eficaces son: Aztreonam, Imipenem, Quinolonas (Ciprofloxacina) y Cefalosporinas (Ceftazidima y Cefoperazona).²²

- *Escherichia coli* (*E. Coli*)

Es una de las bacterias Gram-negativas más estudiadas en Microbiología. Se ha asociado con infecciones intestinales y extraintestinales en seres humanos y muchos animales. En la actualidad, seis grandes grupos intestinales de *E. coli* patógena han sido identificados: enteropatógenas; productora de toxina Shiga; enteroagregativa; enterotoxigénica; enteroinvasiva y difusamente adherente.²³ Además, se han identificado tres tipos patogénicas extraintestinales: causante de meningitis, causante de sepsis y uropatogénico. *E. coli* uropatogénico provoca alrededor del 90% de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Se ha estimado que las infecciones urinarias asociadas al catéter representan una de las causas más comunes de la infección nosocomial.^{24,25} Los fármacos que se emplean para el tratamiento de esta bacteria son: Ampicilina, Cefazolina, Cefotaxima, Gentamicina Sulfato, Kanamicina, Ciprofloxacina.²⁶

I.2 Fármacos antimicrobianos

Los antimicrobianos se definen, como sustancias químicas que a bajas concentraciones pueden tener la propiedad de inhibir el crecimiento microbiano, estos microorganismos están representados por bacterias, virus, hongos o parásitos.²⁷ En los últimos años se ha incrementado la resistencia de los microorganismos hacia estos medicamentos y uno de los factores es la falta de conocimiento de los médicos sobre ellos. El médico general debe conocer cómo actúan estos medicamentos, principalmente los antibacterianos, que son los más utilizados en la práctica médica, y saber en qué situaciones se debe aplicar cada uno para garantizar una mejoría completa y eficaz del paciente, además se debe considerar todo factor que pueda influir en una falla farmacológica.²⁸ Existen otras características de los medicamentos antibacterianos que influyen en la correcta elección del mismo : los efectos adversos de los fármacos, las contraindicaciones y los mecanismos de resistencia realizados por las bacterias para poder inactivar la acción del antibiótico²⁹.

I.2.1 Principales grupos químicos de fármacos antimicrobianos y ejemplos de los mismos

1. Antibióticos Aminoglucósidos: Estreptomina; Neomicina; Amikacina; Kanamicina; Tobramicina; Gentamicina; Espectinomicina.

2. Antibióticos Betalactámicos:

A. Penicilinas:

- Bencilpenicilina (Penicilina G).
- Fenoximetilpenicilina (Penicilina V).
- Carboxipenicilinas: Ticarcilina.
- Isoxazolilpenicilinas: Cloxacilina.
- Aminopenicilinas: Amoxicilina; Ampicilina; Bacampicilina.
- Ureidopenicilinas: Mezlocilina.

B. Cefalosporinas:

1^{ra} generación: Cefadroxilo; Cefalexina; Cefradina; Cefalotina; Cefapirina; Cefazolina.

2^{da} generación: Cefaclor; Cefuroximaaxetilo; Cefprozilo; Cefamandol; Cefonicida; Cefoxitina; Cefuroxima.

3^{ra} generación: Cefixima; Cefpodoximproxetilo; Ceftibuteno; Cefditoreno; Cefminox; Cefoperazona; Cefotaxima; Ceftazidima; Ceftizoxima; Ceftriaxona.

4^{ta} generación: Cefepima; Cefpiroma.

C. Monobactamas: Aztreonam.

D. Carbapenemas: Imipenem; Carbapenem.

3. Anfenicoles: Cloranfenicol.

4. Glicopéptidos: Vancomicina; Teicoplanina.

5. Lincosamidas: Clindamicina; Lincomicina.

6. Macrólidos: Eritromicina; Espiramicina; Losamicina; Midecamicina; Roxitromicina; Azitromicina; Claritromicina.

7. Quinolonas: Ciprofloxacino; Ofloxacino; Levofloxacino; Norfloxacino.

8. Sulfamidas: Trimetoprima; Cotrimoxazol.

9. Tetraciclinas: Doxiciclina. ³⁰

I.2.2 Mecanismos de Acción de Antibacterianos

1. Inhibición de la síntesis proteica a nivel ribosomal

Ej.: Aminoglucósidos, Macrólidos, Cloranfenicol, Tetraciclinas, Lincomicinas.

Modo de acción: Estos fármacos actúan uniéndose a las subunidades del ribosoma, y así interfiriendo en la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la adición de diferentes aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento.³¹ Las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S; el Cloranfenicol, Macrólidos y Lincosamidas se unen a la 50S, y los Aminoglucósidos se unen a ambas subunidades.

2. Los que inhiben la síntesis de la pared bacteriana.

Ej. Penicilinas, Cefalosporinas, Bacitracina, Fosfomicina, Cicloserina, Vancomicina, Ristocetina.

Modo de acción: Son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Inhiben la transpeptidación en las etapas finales de la síntesis del peptidoglicano, polímero esencial para la pared bacteriana. La alteración de la pared produce la activación de enzimas autolíticas que provocan la destrucción de la bacteria. Por su modo de acción, actúan siempre en la fase de reproducción celular, no son efectivos contra formas latentes ni contra gérmenes que no posean pared bacteriana (por ejemplo, micoplasmas).³⁰

3. Los que afectan la síntesis de los ácidos nucleicos y/o metabolismo. Ej. Rifampicina, Quinolonas, Metronidazol.

Modo de acción de las Quinolonas: Son agentes bactericidas que actúan inhibiendo selectivamente la ADN-girasa bacteriana, enzima que interviene en el plegamiento de la doble hélice del ADN, y que es fundamental para la estructura tridimensional correcta del material genético.

4. Antimetabolitos.

Ej. Sulfonamidas, Diaminopirimidinas.

Son generalmente bacteriostáticas y actúan inhibiendo la síntesis del ácido fólico de los organismos susceptibles.³⁰

Modo de acción Sulfonamidas: Actúan inhibiendo la síntesis del ácido fólico de la bacteria, uniéndose a la dihidrosintetasa por su similitud con el ácido para amino benzoico (PABA), impidiendo la formación del ácido tetrahidrofólico

I.3 Estudios antimicrobianos

I.3.1 Generalidades

Los microorganismos que causan perjuicios a la salud humana se están mostrando resistentes a la mayoría de los antimicrobianos conocidos, lo que ha incentivado aún más la búsqueda por antibióticos de origen natural. Actualmente en todo el mundo se vienen desarrollando, alternativas nuevas e interesantes para darle solución a la problemática de la resistencia a los antibióticos y a la imperiosa necesidad de nuevos fármacos dada la escasez de medicamentos eficaces y efectivos.

Entre estas alternativas se encuentran; la secuenciación del genoma bacteriano que ha dado como resultado un importante número de blancos moleculares; el conocimiento y aprovechamiento del mecanismo de acción de pequeños bacteriófagos que lisan la pared bacteriana; los productos de origen natural y sintético; entre otras.³² Extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias de donde ha sugerido usos prácticos de estas actividades en humanos y animales, así como en la industria de alimentos.³³

I.3.2 Metodologías para estudios antimicrobianos ³⁴

Los laboratorios de microbiología clínica pueden escoger diferentes métodos manuales y/o semi-automatizados para realizar una prueba rutinaria de sensibilidad antibacteriana. Estos métodos son basados en principios diferentes y no presentan igual sensibilidad, no obstante, se pueden agrupar en tres metodologías principales: método de difusión, método de dilución y bioautográficos.

- Método de difusión en agar

Los métodos de difusión son comúnmente empleados como ensayos primarios para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En este método, un reservorio es impregnado con la muestra a ensayar a una concentración conocida en superficie del agar,

que ha sido previamente inoculada con el microorganismo. Las placas son incubadas por períodos de tiempo y temperaturas condicionadas por la cinética de crecimiento del microorganismo, para posteriormente medir el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento provocado por la muestra evaluada.

Este ensayo no resulta adecuado para muestras no polares o muestras que no difunden fácilmente en el agar. Además, no es apropiado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), ya que resulta difícil calcular la cantidad exacta de la muestra difundida en el interior del medio, no obstante, algunos autores reportan la CMI determinada visualmente.

- Métodos de dilución

En los métodos de dilución, las muestras a evaluar son mezcladas con un medio adecuado el cual ya contiene inoculado el microorganismo de interés. El rango de aplicación de estos métodos incluye extractos, sustancias puras, muestras polares y no polares. Además, los valores de concentración inhibitoria a diferentes niveles se pueden calcular a partir de una curva concentración-respuesta. Presentan una mayor sensibilidad, permiten diferenciar entre un efecto bactericida y bacteriostático, son económicos ya que se pueden evaluar un gran número de muestras, sus resultados son reproducibles y son considerados como los métodos *in vitro* de referencia.

Los métodos de microdilución son realizados en placas estándar de 96 pocillos. Otras ventajas con respecto a las técnicas de difusión incluyen una alta sensibilidad y el empleo de pequeñas concentraciones de muestras.

- Método bioautográficos

En los métodos bioautográficos se determina la actividad antimicrobiana en placas de cromatografía de capa delgada (CCD) usando tres variantes: (a) método directo, donde el microorganismo crece directamente sobre la placa cromatográfica, (b) bioautografía en agar, los compuestos a ser evaluados son trasladados desde la placa de CCD a una placa con agar ya inoculada y (c) bioautografía de inmersión, en la cual el medio de agar sembrado con el microorganismo es aplicado sobre la placa de CCD. A pesar de su alta sensibilidad, su aplicabilidad se ve limitada a microorganismos que crecen fácilmente sobre las placas de

CCD. No obstante, estos métodos permiten una búsqueda rápida “in situ” de compuestos con potencial antimicrobiano.³⁴

I.4 *Persea americana* Mill. Generalidades

La *Persea americana* Mill, conocida popularmente como aguacate, pertenece a la familia de las Lauraceas, que está formada por 52 géneros y cerca de 3 500 especies; esta es una de las familias más primitivas de las dicotiledóneas. La taxonomía de la *Persea americana* Mill es la siguiente:¹¹

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Dipétala

Orden: Ranales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

I.4.1 Descripción Botánica

Árbol grande o de tamaño mediano, frecuentemente de 20 m de alto, con una copa muy densa, redondeada o alargada, y ramas jóvenes glabras, puberulentas o pilosas, frecuentemente glaucas. Hojas con pecíolos delgados de 2 a 6 cm. de largo, de ovaladas a elíptica, la mayoría de 10 a 30 cm de largo, agudas o acuminadas; desiguales en la base y de agudas a redondas, cartáceas, penninervias, verde oscuras, frecuentemente lustrosas, pálidas y glaucas por el envés, glabras, casi glabras o pilosas, con pelos cortos y esparcidos, especialmente a lo largo de las nervaduras. Inflorescencias, panículas densamente grisáceo-puberulentas o séricas, pocas o muchas, cerca de las terminaciones de las ramas de 6 a 20 cm de largo, pedunculadas; los pedicelos delgados, de 3 a 6 mm de largo, perianto pálido.³⁵

El fruto de esta planta, es una baya con mesocarpio y endocarpio carnosos que contiene una sola semilla. Dicha semilla de *Persea americana* Mill representa entre el 12 – 28% del peso de la fruta, dependiendo de la variedad y la composición química.³⁶

1.4.2 Hábitat y zona de cultivo

Originario de América Central y el Caribe, su cultivo se ha extendido a otras regiones tropicales y subtropicales del planeta. En España, se cultiva en los valles subtropicales del mediodía peninsular en las provincias de Granada y Málaga y en las Canarias. El aguacate puede cultivarse desde el nivel del mar hasta los 2500 m por encima. Sin embargo, su cultivo se recomienda en altitudes entre 800 y 2500 m, para evitar problemas con enfermedades, principalmente de las raíces. La temperatura y la precipitación son los dos factores de mayor incidencia en el desarrollo del cultivo.³⁷

1.4.3 Composición química

La fitoquímica de la especie *Persea americana* Mill ha sido estudiada, pero con destaque para las hojas y el fruto. La composición de esta especie está caracterizada por diferentes grupos de metabolitos, los cuales se pueden dividir en alcoholes (también denominados a veces "acetogeninas alifáticas"), diversos derivados que contienen anillo de furano, glicósidos terpenoides, flavonoides y cumarinas.³⁸

Dentro de la especie se han reportado un grupo de metabolitos denominados "aguacatefuranos", los cuales se caracterizan por tener en su estructura un anillo furano. Un estudio realizado por Maynard D y Trumble J reveló la presencia en el aceite de semillas de la fruta de aguacate de cuatro compuestos de esta clase, los cuales fueron nombrados: 2-(heptadecil)-furano, 2-(1E-penta-decenil)-furano, 2(8Z,11Z-heptadecadienil) furano y el 2-(pentadecil)-furano.³⁹

Los flavonoides, son uno de los metabolitos secundarios con más amplia distribución en el reino vegetal. Varios representantes de este grupo han sido aislados de las hojas de dicha especie vegetal. A partir de una infusión de las hojas de aguacate, un total de 7 flavonoides fueron aislados por cromatografía en columna en fase reversa y sus estructuras fueron establecidas por técnicas de espectrometría UV/vis y de RMN. Estos compuestos fueron nombrados como: kaempferol, quercetina-3-O-a-arabinopiranosídeos, afzelina, quercitina, quercetina-3-O-b-glucopiranosídeo y quercetina.⁴⁰

Otros flavonoides han sido reportados para la especie, entre los cuales podemos citar: astragalina, (-)-epicatequina⁴¹(+)-catequina,⁴²apigenina¹¹y luteolina.^{43,44} Como único

representante de las cumarinas se encuentra la escopoletina, metabolito aislado de las hojas de *P. americana* Mill. Otras clases de compuestos han sido reportados para la especie en estudio, un estudio fitoquímico reveló que el aceite extraído de la pulpa de *P. americana* Mill, presentaba entre sus principales compuestos la vitamina E glicéridos, ácido oleico y un 10% de compuestos insaponificables como esteroides y ácidos volátiles.⁴⁵

De esta especie vegetal han sido identificados también los carotenoides. Se plantea que el carotenoide predominante en este fruto es la luteína, aunque también podemos encontrar α -caroteno, β -caroteno, zeaxantina, neoxantina y violaxantina en pequeñas cantidades.⁴⁴

1.4.4 Propiedades medicinales

Una gran variedad de actividades farmacológicas se ha reportado para los diferentes órganos (hojas, frutos, semillas y corteza) de *P. americana* Mill, debido a la amplia diversidad de metabolitos secundarios presentes en la especie. Los componentes activos identificados en la mayoría de las variedades de esta especie son similares, salvo ciertas variaciones en la proporción de compuestos específicos que se pueden aislar, es por ello que las propiedades farmacológicas de los extractos de diversas variedades se caracterizan por una similitud muy significativa.⁴⁴ En la literatura consultada, a las semillas del fruto de *P. americana* Mill se les reportan diversas propiedades medicinales como anticonceptiva,¹¹ cicatrizante,¹³ anti-diarréica,¹⁴ carminativa,¹⁴ diurética,¹⁴ entre otras. Los efectos anticancerígenos *in vitro* de extractos elaborados con la semilla y el epicarpio de *P. americana* Mill fueron evaluados. El extracto metanólico de semilla de aguacate (100 μ g/mL) mostró propiedades citotóxicas sobre la línea celular MDA-MB-231, al inducir la apoptosis. En este estudio se observó un mayor efecto anticanceroso en la semilla, lo cual puede estar relacionado con mayor presencia de compuestos fenólicos y flavonoides.⁴⁶

En otro estudio los extractos elaborados a partir de la semilla de *P. americana* Mill, provocaron la reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre. En dicha investigación se utilizó como modelo animal ratas, a las cuales se les había tratado previamente con Alloxan (análogo tóxico de la glucosa, que destruye selectivamente las células productoras de insulina en el páncreas). Los resultados mostraron la reducción de entre un 47-55% de la azúcar en sangre, tras la administración por 14 días del extracto

etanólico de semilla. El examen histológico del páncreas de las ratas, confirmó el efecto protector del mismo sobre los islotes del páncreas, corroborando su efecto antidiabético.⁴⁷ Por otro lado, investigadores asiáticos estudiaron las propiedades antioxidantes de esta especie vegetal; demostrando que la semilla tiene mayores propiedades antioxidantes que la pulpa, lo que se puede atribuir al elevado contenido de compuestos fenólicos presentes en la misma. En un estudio realizado por Kim y *col* aislaron y demostraron la presencia de dos compuestos derivados de la persina (persenona A y B) los cuales presentaron propiedades antioxidantes únicas en la fruta del aguacate.⁴⁸ Varios estudios científicos han indagado en las propiedades de la semilla del aguacate para reducir el colesterol, la cual ha sido estudiada en modelos animales a nivel de laboratorio. Extracto de semillas (125, 250 y 500 mg/kg) redujeron significativamente colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad (LDL).⁴⁹ A pesar del interés que se viene mostrando en utilizar cada vez más la semilla de aguacate para diferentes fines medicinales, aún se requieren estudios que permitan relacionar su composición química y sus productos derivados con los efectos etnofarmacológicos reportados y que corroboren, además, algunos de los estudios realizados mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*.



Capítulo II. Materiales y métodos

II.1 Características generales de la investigación

Se realizó un estudio experimental para evaluar la composición química y actividad antimicrobiana de los extractos elaborados de la semilla de *Persea americana* Mill. El estudio se realizó en los laboratorios experimentales pertenecientes al Departamento de Farmacia y Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente sede "Antonio Maceo en el periodo de octubre de 2019 a abril de 2020.

II.2 Recolección y procesamiento del material vegetal

Las semillas de *Persea americana* Mill fueron identificadas taxonómicamente en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) de la provincia de Santiago de Cuba. Las semillas de la planta fueron utilizadas en estado fresco, a las cuales se les retiró la piel que las cubre y luego fueron molinadas en un molino de cuchilla MRC Modelo KM700, disminuyendo el tamaño de partícula para facilitar los procesos extractivos. Finalmente se pesaron 20g de la semilla molinada en una balanza analítica NAGEMA AVIUS2429, para la futura preparación de los extractos.

II.3 Obtención y procesamientos de los extractos vegetales

Se realizaron cuatro extractos mediante dos métodos extractivos, dos extractos por maceración/agitación en una Zaranda: Extracto metanólico por maceración con agitación (**EMma**) y Extracto acuoso por maceración con agitación (**EAm**) y dos extractos mediante un equipo de Soxhlet: Extracto metanólico por soxhlet (**EMs**) y Extracto acuoso por soxhlet (**EAs**). En ambas extracciones se utilizaron dos solventes Agua destilada y Metanol.

Características de las extracciones

-Extracción por Soxhlet: Se realizó por medio de un aparato de Soxhlet durante 6h después del inicio del primer vaciado. En el proceso se utilizaron 20g de la semilla previamente molinada y 100mL del solvente.

-Extracción por Maceración/Agitación: Se empleó una Zaranda JP Selecta 3000974





(España). En el proceso se utilizaron 20g de la semilla molinada, que fueron colocados en un Erlenmeyer, añadiendo a cada 100mL del solvente. La extracción se realizó en un período de 24 horas.

Los cuatro extractos fueron filtrados al vacío utilizando un embudo buchner y papel de filtro. Una vez filtrados los extractos se concentraron en un rotoevaporador KIRKA–WERKE (Alemania) a 45°C para evitar que la temperatura pueda afectar los compuestos químicos presentes en los extractos.

II.4 Determinación de la composición química de los extractos de semilla de *Persea americana* Mill

II.4.1 Determinación de la composición química cualitativa

Se determinó la composición química cualitativa de los extractos mediante los ensayos químicos cualitativos descritos en la técnica del tamizaje fitoquímico (Tabla I), según Ochoa y col⁵⁰. A continuación se describen brevemente estos ensayos para cada uno de los metabolitos:

- *Identificación de alcaloides*: Se realizaron a través de tres ensayos (Dragendorff, Mayer y Wagner). En el ensayo de Dragendorff, la muestra (1 mL) se evaporó a sequedad en baño de agua y luego se redisolvió en 1mL de ácido clorhídrico al 1% en agua, finalmente se añadieron 2 o 3 gotas del reactivo Dragendorff. Para los ensayos de Mayer y Wagner se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Añadiendo finalmente 2 ó 3 gotas del reactivo Mayer y Wagner. Los criterios de resultado positivo leve (+), positivo evidente (++) y positivo intenso (+++) se muestran en la tabla I.

- *Identificación de quinonas*: Las quinonas fueron identificadas por el ensayo de Borntrager. Para realizar el mismo se redisolvió la alícuota en cloroformo, agitando luego con 1 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5 % en agua, mezclando las fases y dejándolas luego en reposo hasta la separación. Los criterios de resultado positivo se muestran en la tabla I

- *Identificación de cumarinas*: Este grupo de metabolitos se determinó mediante el ensayo de Baljet, en el cual se le adicionó a la alícuota del extracto 1 ml del reactivo (0,5 mL Baljet 1



+ 0,5 Baljet 2). Los criterios de resultado positivo se muestran en la tabla I.

- *Identificación de saponinas*: El ensayo de espumas nos permitió determinar la presencia de saponinas tanto de tipo esterooidal como triterpénicas. La alícuota de los extractos se diluye en 5 veces su volumen en agua, agitándose la mezcla fuertemente de 5 a 10 minutos.

- *Identificación de mucílagos*: Una alícuota de los extractos colocada en agua se enfría de 0-5°C. Se consideró positivo si la solución tomaba una consistencia gomosa o gelatinosa al tacto (Tabla I).

- *Identificación de azúcares reductores*: Para determinar la presencia de azúcares reductores se realizaron los ensayos de Fehling y Benedict. Para ambos ensayos la alícuota de cada extracto se redisolvió en 1 o 2 mL de agua, adicionando luego 1 mL del reactivo. La mezcla se calentó en baño de agua de 10 a 30 minutos. Los criterios de resultado positivo para ambos ensayos se recogen en la tabla I.

- *Identificación de fenoles y taninos*: El ensayo de cloruro férrico nos permitió identificar la presencia de fenoles y taninos. A la alícuota disuelta en etanol se le añade 3 gotas de una solución de cloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Los criterios de resultado positivo para este ensayo se recogen en la tabla I.

Tabla I. Ensayos para el tamizaje fitoquímico de un extracto vegetal

METABOLITOS	PRUEBAS	EVIDENCIA
Alcaloides	Dragendorf	(+)opalescencia
		(++)turbidez definida
		(+++)color rojo ladrillo
	Mayer	(+)opalescencia
		(++)turbidez definida
		(+++)color crema blanco o amarillo
	Wagner	Aparece precipitado carmelita
Quinonas	Borntrager	Aparece coloración rosada (++) o roja (+++)



Cumarinas	Baljet	Aparición de coloración (++) o precipitado rojo (+++)
Fenoles y/o taninos	Prueba de Cloruro Férrico	Cambio de coloración - rojo-vino: compuestos fenólicos - verde intenso: taninos pirocatecólicos. - azul: taninos pirogalotanino
Azúcares reductores	Fehling	Aparece coloración roja o precipitado rojo
	Benedict	Aparición de precipitado rojizo
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado Shinoda	Cambio de coloración - amarilla intensa es indicativo de flavonas y flavonoles - anaranjado o guinda es indicativo de flavanonas - rojo guinda o rojo azulado es indicativo de calconas o auronas
	Prueba de álcali	Aparece coloración amarilla o naranja
Saponinas	Prueba de espumas	Aparece espuma de más de 2 mm por varios minutos

II.4.2 Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos

Para la evaluación cuantitativa se consideraron algunos de los metabolitos secundarios que se identificaron cualitativamente en el tamizaje fitoquímico, como: carbohidratos, proteínas totales, fenoles totales, flavonoides totales expresados en % del extracto concentrado. Se generaron curvas de calibración empleando cada una de estas sustancias estándares.

II.4.2.1 Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas de los extractos de *Persea americana* Mill se realizó el

método de Lowry (1951)⁵¹. Las muestras se incubaron con el reactivo de Lowry durante 10 minutos. Este reactivo está compuesto por dos soluciones que se mezclan en el momento de su utilización y que son las siguientes:

A: Carbonato sódico en Hidróxido de Sodio al 0.4%.

B: Sulfato cúprico al 0.5%. En Citrato de sodio al 1%

50 ml de Reactivo A+ 1ml de Reactivo B= Reactivo C

En el momento de su uso, se mezclaron 3 ml de reactivo C con 0,2mL de muestra y 0,6 ml de H₂O destilada. Luego de pasados los 10 minutos, se les añadió 0,3mL de reactivo Folin-Cicalteu, dejándolo reposar por un tiempo de 30-60 minutos. La absorbancia se midió a 650nm. Para la confección de la curva patrón, se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) con el empleo de un intervalo de concentraciones de BSA por mL del extracto.

II.4.2.2 Determinación de carbohidratos

El ensayo se realizó por el método fenol-sulfúrico (Dubois1956).⁵² Se mezclaron 0,5 mL de las muestras con 0,5ml de Agua destilada y 0,5mL de fenol al 5% en tubos de ensayo, colocándolo en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos de ensayo se le añadió 2,5 ml de Ácido Sulfúrico concentrado y se dejó reposar por 30 min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV/VIS (Genesys, Alemania) a una longitud de onda de 490 nm. La curva de calibración se realizó utilizando glucosa en concentraciones de 100-900 µg/mL.

II.4.2.3 Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales presentes en los extractos de la semilla de *Persea americana* Mill se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico), según Palomino y *col* en el año 2009, con algunas modificaciones.⁵³

Para ello se adicionaron en un tubo de ensayo 500µL de solución de los extractos de la semilla y 250 µL de Solución de Folin al 10%, dejándolo reposar durante 5min. Posteriormente les fue agregado 1,250ml de Bicarbonato de Sodio al 20%. Luego de reposar durante 2 horas se leyó en un espectrofotómetro la absorbancia a 760nm.

Se usó una solución de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) entre 80–240 mg/mL para construir la curva de calibración. De esta forma se cuantificará la cantidad de compuestos fenólicos solubles totales presentes en el extracto.

II.4.2.2 Determinación del contenido de flavonoides

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método de Kumazawa y *col* en el año 2004⁵⁴.

Este método consiste en mezclar una alícuota de 0,5 mL de disolución de los extractos de aguacate, con 0,5 mL de solución etanólica de cloruro de aluminio (AlCl₃) al 2%. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 420 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S.

Se usó una solución de Quercitina (Sigma-Aldrich®) entre 5–25 µg/mL, para construir la curva de calibración. La cuantificación de flavonoides se realizó en función del porcentaje de compuestos fenólicos.

II.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la elaboración de los diferentes extractos de la semilla de *Persea americana* Mill se evaluó la potencial actividad antimicrobiana de los extractos, en base a la determinación de las concentraciones de metabolitos secundarios que le confieren fundamentalmente esta actividad.

- Screening antimicrobiano

La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de microdilución con resazurin en microplacas de 96 pocillos.⁵⁵ En cada pocillo se agregaron 10 µL del extracto vegetal evaluado a diferentes concentraciones (1.024 mg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml) y se completó con 190 µl de la suspensión bacteriana en Mueller-Hinton (5 x 10⁴ CFU/mL para *P. aeruginosa* y 5 x 10³ CFU/mL *E. coli*).

Las microplacas fueron encubadas por 24 horas a 37°C y luego se añadió 50 µg/mL por pocillo de resazurin y encubados nuevamente. Luego del segundo periodo de incubación (*Pseudomona* 30 min, *E. coli*: 45 min) las microplacas fueron medidas (fluorescencia (λ_{ex} = 550 nm, λ_{em} = 590 nm) en un lector de microplacas TECAN GENios, Germany. Durante el ensayo se utilizó un fármaco de referencia como grupo control: Doxiciclina para el estudio



con *E. coli* y Ciprofloxacino en el ensayo de *P. aeruginosa*.

II.6 Procesamiento de la información

Para el procesamiento matemático y análisis estadístico de los resultados será utilizado el software Microsoft Excel contenido en el paquete Microsoft Office 2007, para la elaboración de tablas y gráficos. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 7 (Windows, V.7.04, 2017). Los resultados fueron analizados estadísticamente y expresados como la media \pm la desviación estándar (SD). Se realizó un ANOVA de clasificación simple acoplado al test de Tukey para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos.

Capítulo III Resultados y discusión.

Las plantas medicinales constituyen un amplio arsenal terapéutico para el ser humano, avalado por miles de años de práctica tradicional utilizando diferentes partes de la planta para estos fines. El tratamiento de enfermedades infecciosas ocupa un lugar cimero dentro de las patologías más frecuentemente tratadas con remedios herbarios. Esto, unido al uso indiscriminado de algunos antibióticos, resalta el interés en seguir explorando nuevas fuentes de metabolitos activos que exhiban potencial actividad antimicrobiana. De ahí que el presente estudio esté dirigido a explorar el potencial antimicrobiano de extractos derivados de la semilla de aguacate y su posible relación con los constituyentes activos presentes en estos productos.”

III.1. Análisis químico cualitativo de los extractos

Los resultados del tamizaje fitoquímico a los extractos de semillas de *Persea americana* Mill permitieron determinar la posible composición química cualitativa a través de las diferentes reacciones realizadas para cada grupo de metabolitos (Tablas II). El estudio fitoquímico demostró la existencia de alcaloides en todos los extractos, solo en el caso del extracto **EAs**, resultó positivo al ensayo de Wagner, para los otros extractos se observó un cambio de coloración no descrito en la literatura, resultando una evidencia negativa. El resto de los ensayos utilizados para la determinación de este metabolito fueron positivos en los cuatro extractos evaluados.

La coloración verde intenso obtenida en el ensayo del cloruro férrico sugiere la posible presencia de taninos del tipo pirocatecólicos en los cuatro extractos. Nuestros resultados son semejantes con otros estudios fitoquímicos realizado por investigadores mexicanos, los cuales destacaron entre sus principales metabolitos a los taninos, presente en los extractos acuoso y alcohólico de la semilla de esta fruta.⁵⁶ Los taninos también han sido estudiados en otras partes del fruto; Jiménez M y Lazo E identificaron mediante tres métodos cualitativos (reactivos ferrocianuro de potasio, cloruro férrico y tricloruro de hierro) la presencia de taninos en el epicarpio del aguacate.⁵⁷



Tabla II. Resultado del tamizaje fitoquímico para los extractos de semilla de *Persea americana* Mill

Metabolitos	Ensayos	EAmA	EAs	EMma	EMs
Alcaloides	Dragendorff	-	+	-	-
	Mayer	+	+	+++	+++
	Wagner	+	+	+++	+++
Saponinas	Espuma	+	-	+	-
Azúcar reductor	Fehling	+	+	+	+
	Benedict	+	+	+	+
Carbohidratos	Molish	+	+	+	+
Compuestos fenólicos y taninos	Cloruro férrico	+	+	+	+
		Verde intenso	Verde intenso	Verde intenso	Verde intenso
Aminoácidos libres y aminos	Ninhidrina	N/R	N/R	+	+
Quinonas	Ensayo de Borntrager	N/R	N/R	+	+
Cumarinas	Baljet	N/R	N/R	+++	+++
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	+	+	+	+
		(Coloración naranja)	(Coloración naranja)	(Coloración amarillo intenso)	(Coloración naranja)
	Shinoda	+	+	+	+
		(Coloración amarillo-)	(Coloración amarillo-)	(Coloración amarillo)	(Coloración naranja)

	naranja)	naranja)	intenso)	amarillo- naranja)
	+	+	-	-
Álcalis	(Coloración amarillo)	(Coloración naranja rojo)	(Coloración a purpura)	(Coloraci ón purpura)

La identificación de flavonoides se realizó mediante tres ensayos: Ácido sulfúrico concentrado, Shinoda y Álcalis. El ensayo con Ácido sulfúrico concentrado mostró una coloración naranja, indicativa de la presencia de flavononas para tres de los extractos (**EMs, EAs y EAm**) mientras que en el extracto EMma se evidencia la presencia de flavonas y flavonoles mediante la aparición de una coloración amarillo intenso. Mediante el ensayo de Shinoda se detectó la presencia de flavonas para todos los extractos y nuevamente se obtuvieron diferencia en **EMma** donde se identificó además la posible presencia de isoflavonas como se muestran en la tabla II. Mientras que en cambio de coloración evidenció la presencia de calconas y flavonol para los extractos **EAm** y **EAs** respectivamente, en el ensayo de Álcalis, el cual resultó negativo para los extractos metanólicos, lo cual puede estar asociado a la presencia de quinonas, considerada una interferencia en este ensayo ante la aparición de coloraciones de rojo a purpura.

En relación a los grupos de metabolitos pertenecientes a azúcares reductores y carbohidratos, se obtuvieron resultados positivos para cada uno de los ensayos en los extractos vegetales. Estos metabolitos han sido cuantificados por investigaciones precedentes en diferentes órganos de la planta.⁵⁷

Por último, la identificación de saponinas se realizó mediante el ensayo de espuma el cual resultó positivo solo para los extractos elaborados por el método de maceración/agitación (**EAm, EMma**) independiente del solvente utilizado. Las saponinas fue el único grupo de metabolitos que no se detectó en el extracto obtenido por el método de Soxhlet. Estos compuestos generalmente se encuentran en forma de glucósidos (porción polar) y son termoestables. No obstante, durante el proceso de extracción con Soxhlet y producto de las

condiciones térmicas, es probable que ocurra una hidrólisis del glucósido, lo que provoca la pérdida de sus propiedades tensoactivas, base del fundamento del ensayo de espuma que se utiliza para la determinación de estos metabolitos.

No se aprecian diferencias en la composición química cualitativa de los extractos, lo que evidencia que ambos métodos y solventes logran la extracción de la mayoría de los metabolitos presentes en las semillas de *P. americana* Mill, no obstante, pueden existir diferencias en las cantidades que se logran extraer de estos compuestos. Además, la composición química cualitativa para los extractos coincide con lo reportado en la literatura consultada para esta especie.

En un estudio realizado en Ecuador, se determinó cualitativamente mediante un tamizaje fitoquímico la presencia de saponinas, alcaloides, flavonoides y taninos en un extracto alcohólico de semillas de *P. americana* Mill. En relación a los flavonoides y taninos su presencia quedó confirmada además por el estudio cromatográfico realizado al extracto empleando placas de sílica Gel.¹¹ En otro estudio realizado a dos extractos de polaridad diferente (metanol y hexano) de semillas, nuevamente se reportan la presencia de flavonoides, antocianinas, taninos condensados y alcaloides en el extracto metanólico.⁵⁸ El análisis de Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masa realizado al extracto hexánico permitió la identificación de ácido palmítico (21,3%), ácido palmitoleico (1,6%), ácido esteárico (2,2%), ácido oleico (24,1%) y ácido linoleico (27,6%), son un grupo de metabolitos ampliamente reportados para esta especie. De este mismo extracto fueron aislado por cromatografía en columna los compuestos 1,2,4-trihidroxi-nonadecano y el β -sitosterol, los cuales se identificaron mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C (RMN ¹H y ¹³C).⁵⁹

Dentro de la variedad de metabolitos reportados para la especie en otros estudios, los compuestos fenólicos son uno de los más citados. Algunos fenoles como los tocoferoles fueron identificados en extractos cetónicos de la fruta de aguacate.⁵⁸ Por otro lado cabe resaltar la presencia en las semillas y en la pulpa, de un grupo de alcoholes alifáticos conocidos también como acetogeninas alifáticas a los cuales se les asocia muchas de sus

propiedades biológicas,^{38,44} estos compuestos no fueron identificados cualitativamente en los extractos, pues no se reportan ensayos químicos cualitativos para su detección.

III.2 Análisis químico cuantitativo de los extractos

La caracterización química cuantitativa de los extractos de la semilla de *P. americana* Mill se realizó en base a la determinación de las concentraciones de algunos metabolitos secundarios, previamente identificados en el análisis cualitativo, y que pudieran conferirle actividad biológica.

III.2.1 Determinación del contenido de proteínas y carbohidratos

Las proteínas son compuestos cuya característica diferencial de los otros macronutrientes es que son “nitrogenados”, conformados por cadenas de residuos aminoácidos. Mientras que los carbohidratos, son sustancias producidas en el metabolismo primario de las plantas; los mismos poseen un grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas.⁶⁰

La cuantificación de las proteínas presentes en los extractos de semilla de aguacate se realizó por el método de Lowry (1951).⁵¹ Durante el ensayo se combina la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones cúpricos en medio alcalino y la reacción de los grupos aromáticos con el reactivo de Folin-Ciocaltean, con la consiguiente formación de nuevo complejo color azul. La concentración de proteínas fue calculada en base a la curva de calibración obtenida al emplear como patrón Albúmina de Suero Bobino (BSA), donde se obtuvo la ecuación: $y = 2,621x + 0.0298$ con un coeficiente de determinación ($R^2 = 0,999$).

Por otra parte, el método de fenol-sulfúrico (Dubois 1956)⁵² permitió la cuantificación del contenido de carbohidratos presentes en los extractos. La sustancia patrón utilizada para construir la curva de calibración fue la Glucosa, y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 11.545 x + 0.0962 \text{ con un } R^2 = 0,98$$

La tabla III muestra la cuantificación de proteínas y carbohidratos en los cuatro extractos evaluados. Los extractos metanólicos evidencian una mayor concentración de proteínas que los extractos acuosos. Mientras que la cantidad de carbohidratos resultó similar en todos los extractos independientemente del solvente utilizado.

Tabla III. Cuantificación de proteínas y carbohidratos en los extractos de semilla de *P. americana* Mill.

	EAm	EAs	EMma	EMs
Proteínas (%)	11.22	19.06	35.95	37.49
Carbohidratos (%)	21.8	37.04	34.8	37.2

La concentración de proteínas obtenidas en nuestros extractos es superior a la reportada en la bibliografía. Egbunu A y col (2018)⁶¹ determinaron la composición cuantitativa de un extracto etanólico de semilla de aguacate, la concentración de proteínas determinada fue de 2.64 ± 0.01 % del extracto, igualmente Vinha y co⁶² identificaron concentración de proteínas de 2.19 ± 0.16 % para extractos etanólico.

Los carbohidratos fueron identificados en todos los extractos, siendo de los metabolitos estudiados el que se encuentra en mayor concentración. Investigaciones precedentes evidencia la alta concentración de este metabolito en diferentes extractos de *P.americana* Mill, planteando que esta fruta y en especial la semilla puede ser una fuente de carbohidratos con un alto valor energético.^{59, 60, 61}

III.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8000 compuestos distintos. Entre los más representativos se encuentran los taninos, aun cuando otros grupos químicos también lo presentan en su estructura como son los flavonoides y cumarinas.⁶³

La cuantificación de los fenoles totales presentes en los extractos de *P. americana* Mill se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. Durante el ensayo se observó que las muestras presentaron un cambio de color de amarillo tenue a azul oscuro, indicando la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu ante la presencia de compuestos de tipo fenólicos en los extractos. Estos valores fueron calculados en base a la curva de calibración obtenida, empleando como patrón Acido gálico, donde se obtuvo la ecuación:

$$y = 41.993x - 0.0381 \quad \text{con un } R^2 = 0,999.$$

Tabla IV. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de semilla de *P. americana* Mill.

	EAm	EAs	EMma	EMs
Compuestos fenólicos (%)	1.48	1.54	6.10	36.75
Flavonoides (% del total de compuesto fenólicos)	52.33	61	5.89	6.65

Los resultados muestran que la concentración de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos fue superior a la de los extractos acuosos, independientemente del método de extracción utilizado. Comportamiento similar observaron Koto-te-Nyiwa Ngbolua y col⁶⁴ logrando una mayor cuantificación de fenoles en extractos etanólico y metanólicos de hojas de *P. americana* Mill y *Mangifera indica* L. Investigaciones precedentes plantean que el contenido fenólico total y el potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos de aguacate pueden ser afectado por el disolvente de extracción y la variedad utilizada de esta fruta.⁶⁵

Los compuestos fenólicos han sido reportados en varios órganos de la planta, dentro de lo cual resaltan la semilla. Vinha y col⁶² reportan mayor concentración de compuestos fenólicos para las semillas (704.0 mg/100 g) al comparar con la pulpa y la piel del aguacate (410.2, 679.0 respectivamente). Además, han sido aislados de la semilla de aguacate algunos compuestos fenólicos fundamentalmente derivados de (epi) catequina.

Sin embargo, la cuantificación de compuestos fenólicos en nuestros extractos resultó inferior a la reportada por otros autores. Wang y col los determinaron la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la semilla y pulpa de aguacate mediante el ensayo de Folin–Ciocalteu, reportando 88,2 y 1.3 mg/g equivalente a ácido gálico respectivamente.⁶³

La diferencia observada en el contenido de compuestos fenólicos entre nuestros extractos y los reportados en la bibliografía puede atribuirse a las diferencias medio ambientales del lugar de colecta de la planta (clima, temperatura, localización) así como el tiempo de recolección de la fruta.

III.2.4 Determinación del contenido de flavonoides

La cuantificación del contenido de flavonoides se determinó por el método de Kumazawa y *col* 2004.⁵⁴ En esta técnica el catión de aluminio forma complejos estables de color amarillo con los flavonoides, que producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción.

El contenido de proteínas en los extractos fue calculado en base a la curva de calibración obtenida al emplear como patrón la Quercitina, donde se obtuvo la ecuación:

$$y = 18.82x + 0.0003 \quad \text{con un } R^2 = 0,97.$$

El contenido de flavonoides, fue cálculo en función de la cantidad de compuestos fenólicos para cada extracto.

La concentración de flavonoides expuestos en la tabla IV presenta un comportamiento diferente al observado en el contenido de fenoles totales. Los resultados muestran que en los extractos acuosos más del 50% de los compuestos fenólicos identificados corresponde a los flavonoides, mientras que en los extractos metanólicos el porcentaje de cuantificación de flavonoides fue notablemente menor, lo que sugiere la presencia en dichos extractos de otros compuestos fenólicos como los taninos, cumarinas entre otros.

Los flavonoides, son uno de los metabolitos secundarios con más amplia distribución en el reino vegetal. Varios representantes de este grupo han sido aislados de las hojas y semillas de *P. americana* Mill principalmente los derivados de quercetina (quercetina-dihexósido, quercetina-pentosidohexósido, quercetina-glucurónido), además otros flavonoides como kaempferol y afzelina fueron aislados de hojas de aguacate.^{20, 66}

Estudios precedentes abordan las propiedades antimicrobianas de algunos flavonoides. Se plantea que las flavonas presentan acción antimicrobiana, aunque a concentraciones muy elevadas en comparación con los antibióticos. No obstante, se han encontrado que algunas flavanonas de cítricos presentan actividad frente a bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus typhosus*.⁶⁷

III.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana

El excesivo e inapropiado uso de los antibióticos en el tratamiento clínico ha incrementado la resistencia bacteriana y en este sentido las plantas son una atractiva alternativa, pues cuentan con una variedad de compuestos químicos que le confieren propiedades medicinales. Es por esto que en correspondencia con los resultados obtenidos en la caracterización química cualitativa y cuantitativa de los extractos de la semilla de *Persea americana* Mill, se decidió evaluar la potencial actividad antimicrobiana de los mismos.

La figura 1 muestra la actividad de los extractos de semilla de aguacate frente a *Escherichia coli*. En sentido general, los resultados evidencian que los extractos metanólicos logran inhibir el 50% de crecimiento microbiano a concentraciones superior a 512 µg/ml, evidenciándose que no existe diferencia estadística significativa entre los resultados de los extractos metanólicos a altas concentraciones y los del fármaco utilizado como control positivo (Doxiciclina) a bajas concentraciones. Estos resultados muestran una posible actividad antibacteriana a concentraciones superior a 512 µg/ml, mostrando una actividad farmacológica débil e inferior al comparar con algunos fármacos sintéticos.

Investigaciones precedentes han reportado los efectos de diferentes especies vegetales como *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo), *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto) y *Psidium guajava* (guayabo); sobre la viabilidad de *E. coli*. Estas plantas pertenecen a las Familias Lauraceae y Myrtaceae y se destacan en ella la presencia de metabolitos secundarios como flavonoles, taninos y alcaloides que pudieran estar relacionados a la actividad farmacológica evaluada.⁶⁸

En contraste otros autores plantean que la baja actividad de extracto vegetales sobre bacterias como *E. coli* (Gran negativa) puede estar relacionado con las características de su membrana celular. Generalmente las bacterias Gram positivas son más sensibles que las bacterias Gram negativas, pues estas últimas poseen una membrana exterior rica en polisacáridos que dificulta el paso de sustancias lipofílicas hacia el interior del microorganismo.^{69,70}

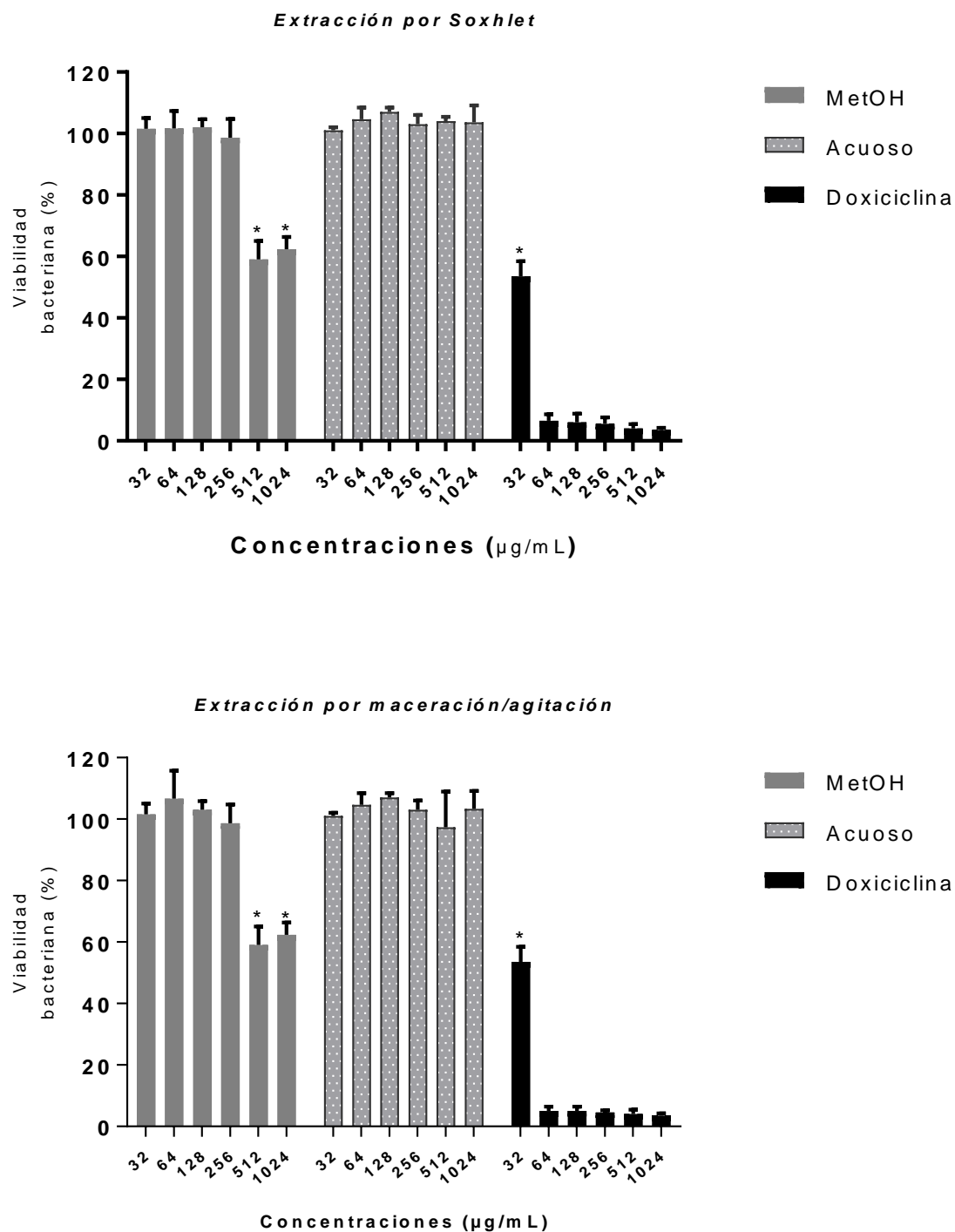


Figura 1. Efectos de los extractos de *Persea americana* Mill sobre la viabilidad de *E. coli*

(*)Indica diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones (Test de Tukey, $p < 0,05$)



Por otra parte, los extractos acuosos evaluados durante la investigación no presentaron actividad a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura1). Estos resultados pudieran estar relacionados con el solvente seleccionado. Durante los procesos de extracción la polaridad del solvente influye en la solubilidad de la sustancia activa, lo que puede conducir a diferencia en su composición química y en consecuencia en su actividad biológica. El análisis cualitativo mostró una semejante composición química en los cuatro extractos, mientras que el análisis cuantitativo evidencia la mayor concentración de metabolitos como los compuestos fenólicos en los extractos realizados con metanol. Lo cual podría ser la razón por la cual en los extractos acuosos no se aprecia efecto sobre el crecimiento bacteriano, propiedad que puede estar relacionada a la concentración de estos metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación exponen un comportamiento similar a otros estudios. Chia and Dykes (2010) evaluaron dos extractos (etanólico y acuoso) de semilla y piel de *Persea americana* Mill sobre un grupo de bacterias Gran positivas y Gran negativas. Los resultados mostraron mejores propiedades antibacterianas para los extractos etanólicos, mientras que el extracto acuoso solo presentó actividad frente a *Staphylococcus epidermidis*.⁷¹

En 2015 Cabrera J, presentó la resistencia de *E. coli* tanto al extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Miller var. Hass “palta” como al ciprofloxacino. Los autores hacen referencia a que refieren que existe una mayor inhibición de los extractos con polifenoles en bacterias Gram positivas que en bacterias Gram negativas, debido a la sensibilidad de las bacterias Gram positivas frente a especies y extractos. Mientras que la resistencia de *E. coli* puede estar relacionada con la superficie hidrofílica de su membrana externa.⁷²

En la figura 2 se describe el efecto de los extractos de semilla de aguacate, sobre la viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados evidencian nuevamente que los extractos acuosos no presentan actividad frente a estos microorganismos.

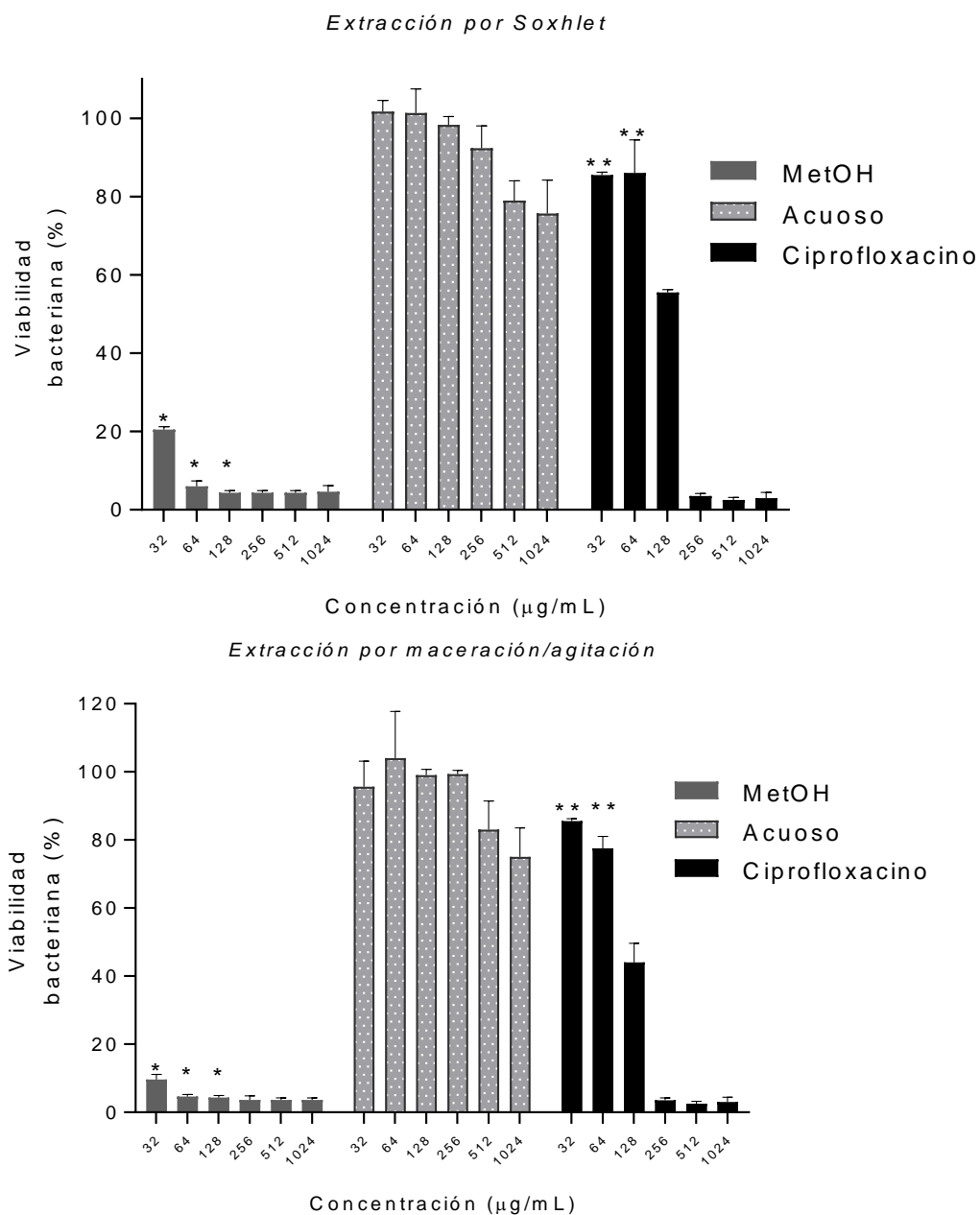


Figura 2. Efectos de los extractos de *Persea americana* Mill sobre la viabilidad de *P. aeruginosa* (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones (Test de Tukey, $p < 0,05$)

En contraste los extractos metanólicos influyeron significativamente en la disminución de la viabilidad, logrando inhibir más del 50% del crecimiento bacteriano a concentraciones de 32 µg/mL.

La figura 2 muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados a igual concentración entre el extracto metanólicos y el control positivo; evidenciándose una actividad antibacteriana más potente para los extractos metanólicos a bajas concentraciones que para el antibiótico a concentraciones semejante. Esto constituye un punto de partida para investigaciones futuras y permite inferir que puede resultar más conveniente un extracto total de una parte de la planta completa, que un principio activo aislado, dado que al existir un conjunto de compuestos químicos actuando sinérgicamente, podrían aumentar la mortalidad del microorganismo, y probablemente disminuiría la probabilidad que éstos desarrollen resistencia a una gran mezcla de ingredientes activos.

Reportes previos demuestran las propiedades antibacterianas de varios órganos de *P. americana* Mill, utilizando diferente técnica experimental. Owusu Boadi y *col* compararon la actividad antimicrobiana de extractos de hoja de *Persea americana* Mill, mediante extracción con diferente solvente (Metanol, Acetato de etilo, Cloroformo y Ether). El extracto metanólico mostró los mejores resultados del estudio (activo frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Además, los investigadores observaron que la polaridad del solvente ejercía un gran impacto en la actividad farmacológica, pues el efecto antimicrobiano decrecía a medida que decrecía la polaridad del solvente.⁶⁹

En 2018 Halil Biyik y *col* evaluaron nuevamente las propiedades antibacterianas de la hoja, mediante el método de Difusión en Agar. Los resultados evidenciaron una actividad moderada para los extractos metanólico y etanólico frente a bacterias como *Streptococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, con un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de 10-11 mm.⁷³

A pesar de que ambos extractos metanólicos disminuyeron la viabilidad de *P. aeruginosa*, observándose un porcentaje de viabilidad inferior a un 50%, es apreciable que existe un efecto ligeramente mayor en **EMma**, resultado que puede estar asociado a las características

propias del método de extracción seleccionadas.

La maceración con agitación es un método general de extracción, simple y que no emplea agente físico; en cambio la extracción con Soxhlet resulta un método de extracción continua que emplea el calor como agente físico y logra la extracción exhaustiva de metabolitos del material vegetal. Este tipo de extracción al emplear calor puede provocar la alteración y/o degradación de metabolitos termolábiles; ⁷⁴ por lo que, aunque las cuantificaciones de algunos metabolitos fuera mayor en **EMs**, utilizar este método de extracción, pudo propiciar la disminución de otros metabolitos con propiedades antibacterianas.

La actividad antimicrobiana mostrada por los extractos metanólicos (Fig. 1 y 2) puede estar relacionada a la presencia de metabolitos previamente identificados para esta especie vegetal. Se expone en la literatura científica que metabolitos como las cumarinas, quinonas y carbohidratos pueden causar la muerte bacteriana por inhibición de la síntesis de ADN o ARN. ⁷⁵

Scalbert y *col*, plantean que los taninos actúan como inhibidor enzimático microbiano de las enzimas extracelulares, impidiendo la síntesis de compuestos necesarios para el crecimiento microbiano y causando daño importante a través de la inhibición de procesos metabólicos en muchas bacterias. La presencia de metabolitos como los taninos y cumarinas puede estar relacionada a la elevada actividad mostrada por **EMma**, cuyo análisis químico cuantitativo permite inferir la presencia de diversos compuestos fenólicos en el extracto. ⁷⁶

Los flavonoides presentes en ambos extractos estudiados, son metabolitos a los cuales se le atribuyen propiedades antimicrobianas. Como se expuso anteriormente se han reportado el aislamiento de diferentes flavonoides de la semilla y otras partes del fruto de *P. americana*, los cuales podrían conferir propiedades farmacológicas a los extractos. Se plantea que los flavonoides y polifenoles presentan actividad antimicrobiana debido al número de grupos hidroxilos que tiene el derivado fenólico y cierto grado de lipofilia, produciendo una inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína, o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas. ⁷²

Por otro lado, otros autores sugieren otros mecanismos por los cuales productos derivados de planta pudieran ejercer actividad frente a bacterias. Estos mecanismos están relacionados a la presencia de grupos fenólicos como los flavonoides, taninos y cumarinas. Estos grupos funcionales posibilitan la interacción con las membranas y otros sitios de acción en las bacterias como las vías biosintéticas de macromoléculas y enzimas.^{77, 78}

En un estudio realizado al aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) que tiene un amplio uso en medicina tradicional; se obtuvo la presencia de un péptido antimicrobiano (AMP) que inhibió la viabilidad de *S. aureus* a partir de 50 g/ml de proteína total (27–38%), y que fue más evidente a 100 g/ml (52–65%). Estos resultados son el primer informe que muestra la actividad antimicrobiana de una defensiva producida por el aguacate y sugiere que este AMP podría utilizarse en el control de patógenos.²⁰

Un análisis integral de los resultados obtenidos, evidencia que los dos extractos metanólicos de las semillas de *Persea americana* Mill constituyen candidatos para seguir siendo objeto de estudios de investigaciones que profundicen y avalen sus propiedades medicinales, dirigido fundamentalmente a corroborar su actividad antimicrobiana.

Conclusiones

1. La composición fitoquímica del extracto de semilla de *P. americana* resultó ser semejante para todos los extractos, dada por la presencia de quinonas, saponinas, taninos, alcaloides y diferentes flavonoides. La cuantificación de metabolitos fue mayor para los extractos elaborados con metanol independientemente del método de extracción utilizado.
2. Los extractos metanólicos de la semilla de aguacate resultaron ser los únicos que mostraron moderada actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y una potente actividad para *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones inferiores que las reportadas para el control de referencia.

Recomendaciones

- Evaluar la actividad antibacteriana de extractos de semilla de *Persea americana* Mill sobre otras bacterias.

Referencias Bibliográficas

- 1- Morón Rodríguez F. Evidencia y uso de plantas medicinales en los sistemas de salud. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2008;13(1), 0-0.
- 2- Beyra, Á., León, M., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G. & Álvarez, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). In *Anales del jardín botánico de Madrid*. 2004. Vol. 61, No. 2, pp. 185-204.
- 3- Cañigüeral S, Dellacassa E, Bandoni AL. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo? Acta farmacéutica bonaerense. 2003; vol. 22, no 3: p. 265-79.
- 4- Herrera MM; Rodríguez RD. Productos Naturales. Rev Cubana Farm, 2005; vol. 39, no 1.
- 5- Anuario estadístico de salud. versión electrónica ISSN: 1561-4433. La Habana 2019.
- 6- Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med. 1982; 97:309-17.
- 7- Hawser SP, Bouchillon SK, Lascols C, Hackel M, Hoban DJ, Badal RE, Woodford N, Livermore DM. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates from intra-abdominal infections and molecular characterization of ertapenem-resistant isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55:3917-21.
- 8- Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Rev Panam Salud Publica. 2001;10:284-93.
- 9- Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):260-71`
- 10- Di Conza JA, Gutkind GO. Integrons: gene collectors. Rev Argent Microbiol. 2010; 42:63-78.
- 11- Quispe J, Suazo F. "Efecto anticonceptivo del extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* en ratones hembras durante el periodo enero-marzo 2014". Tesis

- para optar por el Título de Licenciado En Obstetricia. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina. Perú 2014.
- 12-** San, P. P., & Kyaw, T. Chemical Characterization, Antioxidant Activity and GC-MS Analysis of the Extracted Oil from Seeds of *Persea americana* Mill. (Avocado). 2019
- 13-** García R, Raventós R, García R. Estudio de la acción del aguacate sobre el proceso de cicatrización en ratas de experimentación quemadas. Revista Archivos Médicos de Camagüey. 2015.
- 14-** Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ed. Ciencia Técnica, 1988Habana, Cuba.
- 15-** Mariane, E., Rodrigues, D., Biondo, F., Batoqui, P., Jorge, V., & Vergilio, J. Use of avocado peel (*Persea americana*) in tea formulation: a functional product containing phenolic compounds with antioxidant activity. Acta Scientiarum-Technology. 2016
- 16-** Castro-lópez C, Polyphenolic profile and antioxidant activity of leaf purified hydroalcoholic extracts from seven Mexican *Persea americana* cultivars. Molecules. 2019; vol. 24, no 1: p. 173.
- 17-** Leite JJG y col. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009 42(2):110-113.
- 18-** Rajeshkumar, S. Rinitha, G y col Nanostructural characterization of antimicrobial and antioxidant copper nanoparticles synthesized using novel *Persea americana* seeds. OpenNano.2018: Vol 3(18–27)
- 19-** Yasir, C y col. Phytopharmacological profile of *Persea americana*. Pharmacognosy Reviews. January-June 2010, Vol 4, Issue 7
- 20-** Chil-Núñez, I., Molina-Bertrán, S., Ortiz-Zamora, L., Dutok, C., & Souto, R. State of the Art of the specie *Persea americana* Mill (avocado). *Amazonia Investiga*.2019: 8(21), 73-86.
- 21-** Piatkin K, Krivishein Y. Microbiología. Editorial MIR. Moscú. 1981: 98-120.
- 22-** Hernández LA, Vivanco MV, Silva JL. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo I. Ciudad de La Habana. 2001:460, 532

- 23-** Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2004; 2:123–140.
- 24-** Dwyer LL, Harris-Kojetin LD, Valverde RH, Frazier JM, Simon AE, Stone ND, Thompson ND. Infections in long-term care populations in the United States. J. Am. Geriatr. Soc. 2013; 61:342–349.
- 25-** Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME. Complicated catheter associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin. Microbiol. Rev. 2008; 21:26–59.
- 26-** Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología. Formulario Nacional de Medicamentos. La Habana, Cuba. 2003: 131-190.
- 27-** Diccionario Médico de bolsillo Dorland 24ª ed. Madrid: McGraw- Hill Interamericana; 1993.
- 28-** Kasper D. et al. Tratamiento y profilaxis de las Infecciones Bacterianas. Principios de Medicina Interna. 16ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana;2006. p.884-902.
- 29-** Kasper D. et al. Principios de Farmacología Clínica. Principios de Medicina Interna. 16ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2006. p.14-29.
- 30-** Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. Artículo Disponible en: URL: <http://infodoctor.org/gipi/>. Visitado: 17 de febrero de 2020.
- 31-** Ceriana P. y col. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología Boletín Nº 9 Servicio Antimicrobianos Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas ANLIS. Septiembre 1998
- 32-** Archer G., Polk R. Tratamiento y profilaxis de las Infecciones Bacterianas. Principios de Medicina Interna. 16ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2006. p.884-902.
- 33-** González M., Lopera W., Arango A. Fundamentos de Medicina Manual de Terapéutica 2008-2009. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas;2008.

- 34-** Das K, Tizari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *J Med Plant Res.* 2010 4 (2): 104-111.
- 35-** Páez, F. A. R., Salazar, V. G., Acosta, J. G. G., & López, P. A. O. Caracterización molecular, análisis morfológico y colonización micorrízica en la rizósfera del aguacate (*Persea americana* Mill) en Caldas, Colombia. *Acta Agronómica.* 2016, 65(4): 398405.
- 36-** Bernal J, Díaz C, Tamayo A, Córdoba O, Londoño M, Tamayo P et al. Tecnología para el Cultivo del Aguacate [Versión digital PDF] (1ªEd.). Colombia: CORPOICA. 2008:11-23.
- 37-** Chunga Mejia A. Determinación de la acción antimicótica *in vitro* de un gel elaborado a partir del Aloe vera y *Persea americana*. Trabajo en opción al título de Químico y Farmacéutico. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas. Ecuador 2014.
- 38-** Mohammad Y, Sattwik D, Kharya M.D. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. REVIEW ARTICLE. *Pharmacognosy Reviews* January-June 2010, 4 (7).
- 39-** Rodriguez-Saona C, Maynard DF, Phillips S, Trumble JT. Avocadofurans and their tetrahydrofuran analogues: Comparison of growth inhibitory and insecticidal activity. *J Agric Food Chem* 2000; 48:3642-5.
- 40-** Almeida AP, Miranda MM, Simoni IC, Wigg MD, Lagrota MH, Costa SS. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytother Res* 1998; 12:562-7.
- 41-** Rodríguez M, Bisset J, Milá L, Calvo E, Díaz C y Soca L. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *REV CUBANA MED TROP* 1999;51(2):83-8.
- 42-** Cortinhas L. Bioatividade do alcalóide episolamargina extraído de *Solanum crinitum* Lam (Solanaceae) sobre o desenvolvimento pos-embriionario de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. Monografia (Graduando em Biologia) Universidade Gama Filho. Rio de Janeiro. 2012.

- 43- Estrada Ortiz J, López Díaz MT, Castillo Rodríguez BZ et al. Potencialidades del uso de Nim y sus bioproductos en la producción agropecuaria ecológica y sostenible. *Agricultura Orgánica*. 2002; 8(3): 18-21.
- 44- Dabas D, Shegog R, Ziegler G y Lambert J. Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. *Current Pharmaceutical Desing*, 2013, 19: 61336140
- 45- Ceballos, A M; Montoya, S. Evaluación química de la fibra en semilla, pulpa y cáscara de tres variedades de aguacate. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 2013, vol. 11, no 1, p. 103-112.
- 46- Lee, S. G., Yu, M. H., Lee, S. P., & Lee, I. S. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2008, 37(3): 269-275. 70
- 47- Edem, D. O. Hypoglycemic effects of ethanolic extracts of Alligator Pear Seed (*Persea americana* Mill) in rats. *Eur J Sci Res*. 2009, 33(4): 669-678.
- 48- Kim HW, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. Screening of edible Japanese plants for suppressive effects on phorbol esterinduced superoxide generation in differentiated HL-60 cells and AS52 cells. *Cancer Lett* 2002, 176: 7-16.
- 49- Pahuá-Ramos M E, Ortiz-Moreno A, Chamorro-Cevallos G, Hernández-Navarro M D, Garduño-Siciliano L, Necochea-Mondragón H, & Hernández-Ortega M. Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. *Plant foods for human nutrition*. 2012, 67(1): 1016.
- 50- Ochoa AP, López TG, Colombat MR. *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. Monografía. Editado en CD-ROM ISBN 959-207-012-1. ISBN 959-207-049-0: 2002; 15-30 32.
- 51- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J of BioChem*; 1951:193:265-75.
- 52- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Robers P, Smith F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem*. 1956; 28: 350-356.

- 53- Lady P. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 2009;16(3): 388-95.
- 54- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem. 2004;84 (3): 329-339.
- 55- Cos, P., Vlietinck, A.J., Vanden, D., Maesa, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. J of Ethnopharma. 106, 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>.
- 56- Pahua M, Ortiz A, Chamorro G, & Garduño L. Estudio de las Propiedades de la Semilla de Aguacate (*Persea americana*) Variedad Hass, para el Aprovechamiento Integral del Fruto. In *IX congreso deficiencia de los alimentos y V foro deficiencia y tecnología de alimentos*. 2007
- 57- Jiménez Molina M, Lazo Flores E. Determinación de taninos en epicarpio de *Persea americana* G. (aguacate), corteza de *Psidium guajava* L. (guayabo) y semilla de *Vitis vinífera* DC. (VID). Trabajo presentado en opción al título de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de el salvador 2005.
- 58- Ranade S S, & Thiagarajan P. A Review on *Persea americana* Mill. (Avocado)-Its Fruits and Oil. *Int. J. PharmTech Res.* 2015, 8(6): 72-77.
- 59- Leite J G G, Brito É H S, Cordeiro R A, Brilhante R S N, Sidrim J J C, Bertini L M & Rocha M F G. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2009, 42(2): 110-113
- 60- Liu D, Sheng J, Li Z. Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013; 56: 1-5.
- 61- Egbuonu A. Proximate, Functional, Antinutrient and Antimicrobial Properties of Avocado Pear (*Persea americana*) Seeds. *J Nutr Health Food Eng* 2018, 8(1): 00260

- 62- Vinha, A. F., Moreira, J., & Barreira, V. P. S. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Agricultural Science*. 2013, 5: 100-109.
- 63- Wang, W., Bostic, T. R., & Gu, L. Antioxidant capacities procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. 2010: 122, (1193-1198).
- 64- Koto-te-Nyiwa Ngbolua, et al. A mini-review on the Phytochemistry and Pharmacology of the medicinal plant species *Persea americana* Mill. (Lauraceae) *Discovery Phytomedicine* 2019; 6(3): 102
- 65- Rodríguez-Carpena J.G., Morcuende D., Andrade M.J., Kylli P. y Estevez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, *In vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 5625– 5635.
- 66- Basante, Jessica Y Cruz, Silvia Y Osorio, Coralia y Hurtado, Nelson Obtención, fraccionamiento y determinación de la composición de extractos polifenólicos de aguacate (*Persea americana* Mill). In: Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, 2016, Bogota, Colombia.
- 67- Rice-Evans C. y col. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*, 1996, vol. 20, p. 933-956.
- 68- Padrón Márquez B. Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae. Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Química de Productos Naturales. Diciembre, 2010
- 69- Owusu M B., Saah A. Phytoconstituents, antimicrobial and antioxidant properties of the leaves of *Persea americana* Mill cultivated in Ghana *Journal of Medicinal Plants Research*: 25 September, 2015. Vol. 9(36), pp. 933- 939
- 70- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000; 88: 308.
- 71- Chia, T.W.R. and Dykes, G.A. Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. *Pharmaceutical Biology*, 2010. 48(7):753-756.

- 72-** Cabrera J y col. Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Mill var. Hass “palta”. *Perspectiva*. 2015;16(18):209-219 1996-5257
- 73-** HalilBiyik, H. Antibacterial and anticandidal effects of the leaf extracts of *Persea americana* Mill. *Annals of Phytomedicine*. 2018, 7(2): 88-93,
- 74-** Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products. Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem.Analysis*. 2002; 13: 105–113.
- 75-** Sánchez E y col. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume*
- 76-** Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991 30, 3875–3883.
- 77-** Silva NCC, Fernàndes-J. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2010; 16(3): 402-413.
- 78-** Saritha K, Rajesh A, Manjulatha K, Setty OH, Yenugu S. Mechanism of antibacterial action of the alcoholic extracts of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. ex Schult, *Leucas aspera* (Wild.), *Plumbago zeylanica* L., and *Tridax procumbens* (L.) R. Br. ex Schult. *Front. Microbiol*. 2015; 6(577): 1-9.